

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE LA
RESPUESTA ANTIVIRAL EN PACIENTES CON SARS-COV-2 Y SU RELACIÓN
CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA**

PRESENTA:


LIC. EN MICROBIOLOGÍA KAREN ROCÍO VILLASEÑOR ZEPEDA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR
E INGENIERÍA GENÉTICA**

JUNIO 2021

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE LA
RESPUESTA ANTIVIRAL EN PACIENTES CON SARS-COV-2 Y SU RELACIÓN
CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA**

Aprobación de la tesis:



DR. EN C. GERARDO RAYMUNDO PADILLA RIVAS

Director de Tesis



DRA. EN C. SONIA AMELIA LOZANO SEPÚLVEDA

Co-director de Tesis



DR. EN C. JOSÉ FRANCISCO ISLAS CISNEROS

Miembro de la comisión



DR. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

De manera especial le agradezco a mi asesora: la Dra. Sonia Amelia Lozano Sepúlveda, gracias por siempre apoyarme en cualquier duda, estar al pendiente de mí y explicarme con paciencia e interés genuino en mi formación. Le agradezco mucho la oportunidad de haberme aceptado como estudiante.

Agradezco también a todo el equipo del Centro de Investigación e Innovación en Virología Médica: Dra. Ana María Rivas Estilla, Dr. Kame Galán Huerta, Dra. Natalia Martínez Acuña, Dr. Daniel Arellanos Soto. A mis compañeras de laboratorio que siempre que tuve dudas me aconsejaron, explicaron y recibieron siempre con los brazos abiertos: Mayra Meléndez, Fernanda Herrera, Magda Vera, Cynthia Martínez, Paulina Moreno y Tania Heredia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado durante el desarrollo de la maestría.

Le agradezco también al Dr. Gerardo Raymundo Padilla Rivas, quien me asesoró a lo largo de mi proyecto de tesis, también al Dr. José Francisco Islas Cisneros por formar parte de mi comisión de tesis.

Gracias a mis padres y mis hermanos, que me apoyaron durante esta etapa de mi formación, por siempre haber estado dispuestos a escucharme y mostrarme su amor.

Gracias a Jairo, porque su apoyo fue esencial.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Biología molecular de SARS-CoV-2	3
1.2. Ciclo viral de SARS-CoV-2	7
1.3. Mecanismos moleculares de patogénesis por SARS-CoV-2	8
1.4. Presentación clínica.....	12
1.5. Epidemiología	13
1.6. Tratamiento	14
1.7. Vacunas	15
2. JUSTIFICACIÓN	17
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivo general	19
4.2. Objetivos específicos	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1 Materiales.....	20
5.1.1 Reactivos	20
5.1.3 Equipos.....	21
5.2. Métodos	22
5.2.1 Estrategia general.....	22
5.2.2 Obtención de las células mononucleares de sangre periférica y suero	22
5.2.3 Extracción de RNA.....	23
5.2.4 Control de calidad RT-qPCR para RNasa P	24
5.2.4 Retrotranscripción y qPCR.....	25
5.2.7 Inmunoensayo múltiple.....	26
5.2.8 Análisis estadístico.....	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1 Cohorte de pacientes hospitalizados con COVID-19	28
6.2 Concentración y control de calidad del RNA obtenido a partir de PBMC de la cohorte de pacientes hospitalizados con COVID-19	29

6.3 Evaluación de la expresión diferencial de genes de respuesta antiviral en PBMC de pacientes hospitalizados con COVID-19 en comparación con sujetos controles	32
6.4 Evaluación de la expresión diferencial de genes de respuesta antiviral en PBMC de pacientes hospitalizados sobrevivientes y fallecidos con COVID-19	34
6.4 Cinéticas de la expresión de genes de respuesta antiviral diferencialmente expresados en PBMC de pacientes hospitalizados sobrevivientes y fallecidos con COVID-19	39
6.4 Evaluación de la expresión diferencial de genes de respuesta antiviral en PBMC de pacientes hospitalizados sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 en etapas tempranas de la hospitalización	44
6.4 Evaluación de las concentraciones de citocinas en suero involucradas en el proceso inflamatorio de pacientes hospitalizados sobrevivientes y fallecidos con COVID-19	47
6.4 Evaluación de las concentraciones de citocinas en suero involucradas en el proceso inflamatorio de pacientes hospitalizados con COVID-19 en comparación con controles sanos	49
6.5 Análisis de datos demográficos y clínicos de pacientes hospitalizados sobrevivientes y fallecidos con COVID-19	54
7. DISCUSIÓN.....	58
8. CONCLUSIONES.....	66
9. REFERENCIAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del genoma de SARS-CoV-2 y de la partícula viral.....	4
Figura 2. Topología de las poliproteínas pp1a y pp1ab.....	4
Figura 3. Ciclo de replicación viral de SARS-CoV-2.....	8
Figura 4. Estrategia general.....	22
Figura 5. Control de calidad del RNA obtenido a partir de PBMC de pacientes hospitalizados con COVID-19.....	32
Figura 6. Genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 al ingreso hospitalario.....	35
Figura 7. Genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 al día 7 de hospitalización.....	39
Figura 8. Cinéticas de expresión de los genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 a lo largo de los cuatro tiempos de hospitalización evaluados.....	44
Figura 9. Genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 al día 3 de hospitalización, cuando se normaliza la expresión con respecto al día de ingreso hospitalario.....	46
Figura 10. Concentración de citocina IL-10 entre el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 al día 7 de hospitalización.....	48
Figura 11. Cinética de la concentración de la citocina IL-10 encontrada en el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 a lo largo de los cuatro tiempos de hospitalización evaluados.....	49
Figura 12. Concentración de las citocinas que mostraron una diferencia entre grupos de pacientes hospitalizados con COVID-19 y controles sanos al día 0, 3 y 7 de hospitalización.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas no estructurales de SARS-CoV-1 y 2.....	6
Tabla 2. Citocinas reportadas en casos de COVID-19 y su función normal.....	10
Tabla 3. Condiciones de RT-qPCR para RNasa P.....	24
Tabla 4. Datos demográficos de los pacientes del estudio.....	28
Tabla 5. Datos demográficos de los sujetos controles del estudio.....	29
Tabla 6. Concentración y cocientes de calidad obtenidos a partir de las PBMC de la cohorte de pacientes hospitalizados con COVID-19.....	29
Tabla 7. Genes diferencialmente expresados en pacientes hospitalizados con COVID-19 en comparación con controles sanos.....	33
Tabla 8. Análisis de datos demográficos y clínicos de los pacientes hospitalizados sobrevivientes y fallecidos con COVID-19.....	54

ABREVIATURAS

°C = Grados centígrados

µg = Microgramos

µl = Microlitros

µM = Micromolar

cDNA = Acido desoxirribonucleico complementario

Cofepris= Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

COVID-19 = Enfermedad por coronavirus 2019

Ct = Ciclo de umbral

DEPC = Dietilpirocarbonato

DMSO = Dimetil sulfóxido

DNA = Ácido desoxirribonucleico

dNTPs = Desoxirribonucleótidos trifosfatados

EDTA K2 = Ácido etilendiaminotetraacético dipotásico

ELISA = Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima

g = Gramos

h = Horas

IFN = Interferón

IL = Interleucina

IRF3 = Factor regulador de interferón

ISG = Genes estimulados por interferón

JAK = Cinasa Janus

L = Litro

MAPK = Proteína cinasa activada por mitógenos

mg = Miligramos

min = Minutos

ml = Mililitros

mM = Milimolar

mRNA = RNA mensajero

MERS-CoV = Coronavirus asociado al Síndrome Respiratorio de Oriente Medio

NF-Kb = Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

ng = Nanogramos

OMS = Organización Mundial de la Salud

ORF = Marco de lectura abierto

PBMC = Células mononucleares de sangre periférica

PBS = Buffer de fosfatos salino

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

pH = Potencial de hidrógeno

qPCR = Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real

RE = Retículo endoplásmico

RNA = Ácido ribonucleico

rpm = Revoluciones por minuto

RT = Transcripción reversa o retrotranscripción

RT-PCR = Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa

s= Segundos

SARS-CoV = Coronavirus asociado al Síndrome Respiratorio Agudo Grave

SARS-CoV-2 = Coronavirus asociado al Síndrome Respiratorio Agudo Grave 2

STAT = Transductor de señales y activador de la transcripción

TLR = Receptores tipo Toll

TNF- α = Factor de necrosis tumoral alfa

TRIF = Adaptador que contiene el dominio TIR inductor de interferón

UTR = Región no codificante

VEGFA = Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

Introducción: La infección por el nuevo coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 por sus siglas en inglés) provoca la enfermedad conocida como COVID-19, la cual fue designada como una pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 11 de marzo del 2020. Aunque en el 80% de los casos se COVID-19 no hay complicaciones, los casos severos de esta enfermedad se asocian a complicaciones que pueden llevar a la muerte. La progresión clínica de pacientes con enfermedad severa puede ocurrir de manera rápida, por lo que es necesario el identificar biomarcadores de pronóstico en pacientes con COVID-19, para tener un mejor manejo de los pacientes que requieren hospitalización y cuidados intensivos.

Objetivo: Evaluar la expresión de los marcadores de la respuesta antiviral en pacientes con SARS-CoV-2 y su relación con la evolución clínica.

Material y métodos: Se realizó un estudio longitudinal con una cohorte de pacientes hospitalizados con COVID-19, de los cuales se obtuvieron muestras de sangre al día 0, 3, 7 y 14 de hospitalización. De estas muestras de sangre se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica para la evaluación de la expresión de genes de la respuesta inmune innata antiviral. También se obtuvieron muestras de sangre para llevar a cabo la cuantificación de citocinas en suero asociadas al proceso inflamatorio de la infección por SARS-CoV-2. Con los datos obtenidos y el historial clínico de los pacientes, se realizó un análisis estadístico para determinar qué variables se encuentran asociadas a los pacientes que fallecieron por COVID-19, en comparación con quienes sobrevivieron a esta enfermedad.

Resultados y conclusiones: Se encontró una firma génica en las PBMC de los pacientes hospitalizados con COVID-19, en donde CASP8, CCL5, CHUK, CXCL11, FOS, IFNA1, IFNA2, IFNB1, IL12B, MAP2K1, MAP2K3, MAPK14, MAPK3 PYDC1, RELA, SPP1 y TRAF3 se encontraron incrementados, mientras que CD86, CTSS, IRF5, MEFV, TLR8 y TRADD se encontraron disminuidos. La expresión de los genes MX1 y OAS2 al día del ingreso hospitalario se encontró incrementada en las PBMC de los pacientes que fallecieron, en comparación con los que sobrevivieron. Al día 7 de hospitalización se encontraron incrementados los genes RIPK1, NOD2, CXCL9, DHX58, PYDC1, FADD, IFNA1, IFNA2, IL12B y TRAF6, mientras que CD86 se encontró disminuido en las PBMC de pacientes que fallecieron con COVID-19. Además, se encontraron disminuidos los genes: CARD9, CCL5, IFNB1, IL15, IL18 PIN1 y TLR3 en las PBMC de pacientes fallecidos con COVID-19 al tercer día de hospitalización en comparación con el día de ingreso hospitalario. Por otro lado, se encontró incrementada la concentración de creatinina al ingreso hospitalario, así como la concentración de IL-10 en suero al día 7 de hospitalización en los pacientes fallecidos por COVID-19, en comparación con los sobrevivientes. Finalmente, se encontró una relación de dependencia entre el fallecimiento de los pacientes y el sexo masculino, niveles más altos en el índice de severidad de neumonía PSI, el haber recibido hemodiálisis, el ser negativo para IgG contra SARS-CoV-2, así como la subexpresión de CD86 y la sobreexpresión de NOD2 al día 7 de hospitalización, respectivamente.

1. INTRODUCCIÓN

En diciembre del 2019 se reportó un brote de neumonía de origen desconocido en la ciudad de Wuhan, capital de la provincia de Hubei en China, la mayoría de los casos fueron vinculados a un mercado de alimentos (1,2). A partir del lavado broncoalveolar de pacientes con esta neumonía de origen desconocido y vinculados al mercado de alimentos, se aisló un nuevo virus de la familia *Coronaviridae* (1). Este nuevo coronavirus fue denominado inicialmente como 2019-nCov y posteriormente nombrado como coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 por sus siglas en inglés) (3).

Dentro de la familia de los coronavirus, algunos miembros de esta familia han surgido como virus emergentes, es decir, virus que han logrado cruzar la barrera que existe entre las especies y así causar patologías en una nueva especie (4). En las últimas dos décadas, ha habido dos eventos previos al SARS-CoV-2, en donde nuevos coronavirus han surgido y se han asociado a enfermedades respiratorias en humanos. Tal es el caso del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV por sus siglas en inglés) que emergió en el sur de China en 2003, posteriormente en 2012 apareció en Arabia Saudita, el coronavirus asociado al síndrome respiratorio de Medio Oriente (MERS-CoV por sus siglas en inglés) (5,6).

La enfermedad clínica que provoca el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 fue nombrada COVID-19 y fue designada como una pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 11 de marzo del 2020 (7). Al día 31 de mayo de 2021, se han reportado 169 597 415 casos confirmados y 3 530 582 muertes a nivel mundial (8). Mientras que en México, se han confirmado 2 412 810 casos y 223 507 defunciones por esta enfermedad (9). Los casos de COVID-19 siguen causando muertes, por lo que es de vital importancia seguir investigando para favorecer el desarrollo de agentes terapéuticos y de protección contra SARS-CoV-2.

1.1. Biología molecular de SARS-CoV-2

Los coronavirus causan enfermedades gastrointestinales y respiratorias en distintos vertebrados, incluyendo enfermedades respiratorias menores en humanos (10). Los coronavirus son miembros de la subfamilia *Coronavirinae*, en la familia *Coronaviridae*, dentro del orden de los Nidovirales (10). Los Nidovirales son llamados así, debido al sobrelape de una serie de transcritos utilizados para la traducción de sus proteínas. La familia *Coronaviridae* se subdivide filogenéticamente en cuatro géneros: α , β , γ y δ (11).

De acuerdo a las características genómicas del virus y a las relaciones filogenéticas que se establecieron, el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 forma parte de los Betacoronavirus (12). Las secuencias genéticas de SARS-CoV-2 mostraron más de un 80% de identidad con SARS-CoV y un 50% con MERS-CoV (3,13).

Los coronavirus son virus de RNA de cadena positiva que contienen genomas que van de 27 a 32 kb y que presentan un extremo 5' con caperuza y un extremo 3' poliadenilado (Figura 1) (10). El genoma de los coronavirus se compone de una región que codifica para las proteínas estructurales y de una región más grande que codifica para dos marcos de lectura abiertos 1a y 1b, que juntos codifican para las proteínas no estructurales del virus que participan de forma colectiva como la RNA polimerasa viral (Figura 2) (14). Cada secuencia del virus es traducida como una poliproteína precursora pp1a y pp1b. Pp1b se obtiene por un cambio de marco de lectura que ocurre al final de la secuencia codificante 1a. Las proteasas virales procesan a las poliproteínas pp1a y pp1b en 16 proteínas no estructurales nombradas como nsp1-16 (15).

La familia *Coronaviridae* está formada por virus estructuralmente complejos que se componen de cuatro a cinco proteínas estructurales, además de proteínas no estructurales (nsp por sus siglas en inglés) (16). Dentro de las proteínas estructurales que todos los virus de este grupo contienen están: la proteína de nucleocápside (N), de espícula (S), de envoltura (E) y de membrana (M). Mientras que sólo algunos contienen la proteína estructural: hemaglutinina esterasa (10).

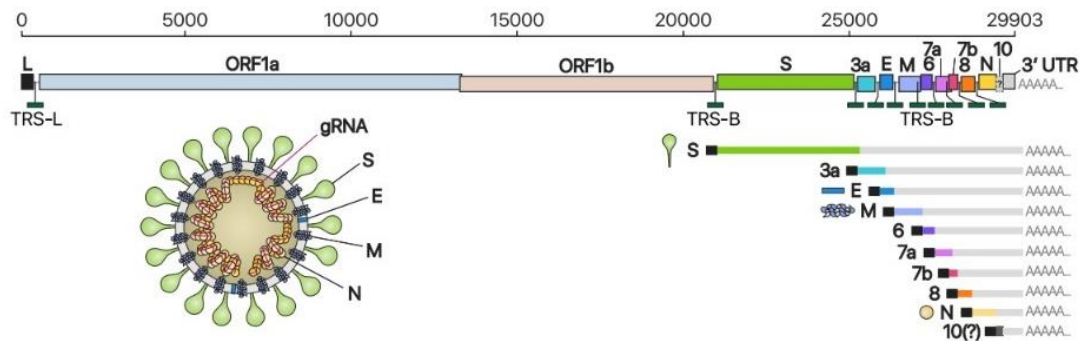


Figura 1. Esquema del genoma de SARS-CoV-2 y de la partícula viral (17).

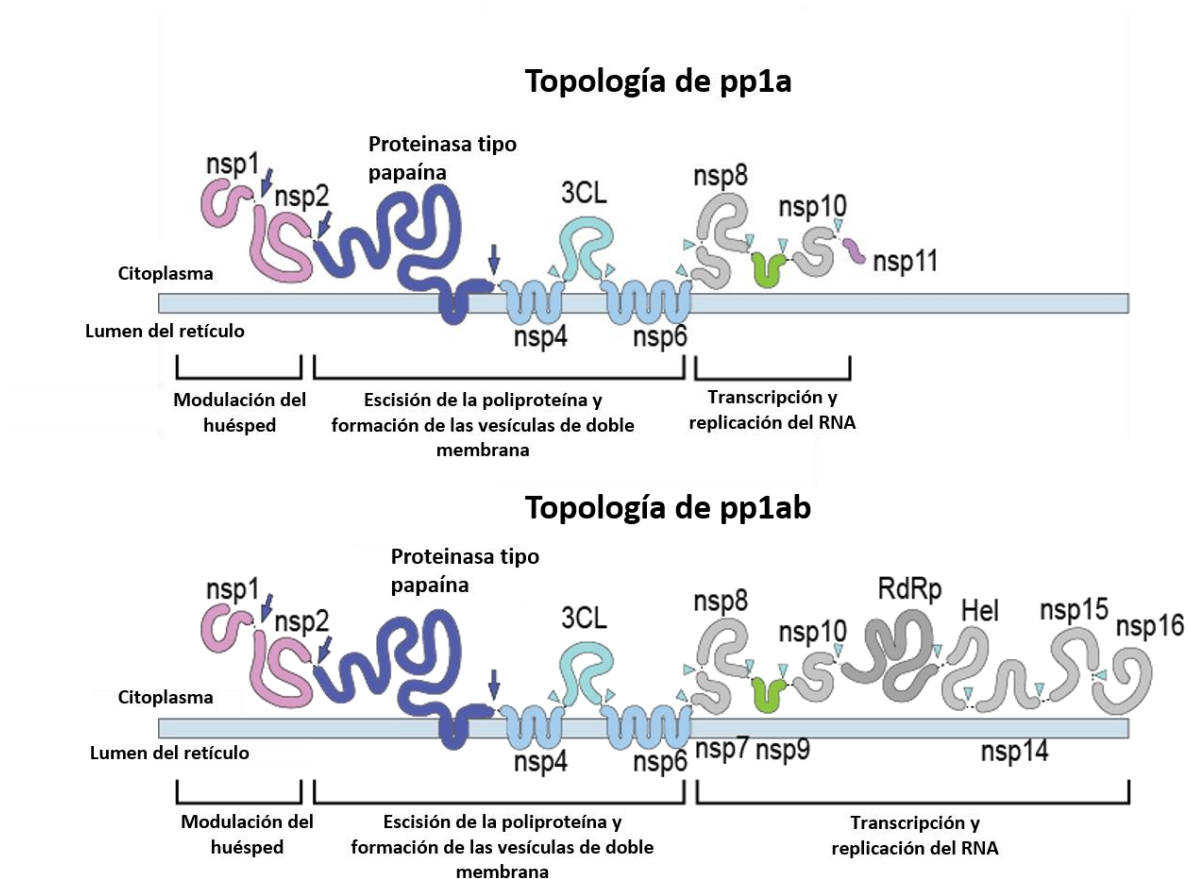


Figura 2. Topología de las poliproteínas pp1a y pp1ab (Tomado de 46).

SARS-CoV-2 posee la estructura genética acorde con la familia de los coronavirus, expresa la proteína S, N, M y E; además de una RNA polimerasa, una proteasa tipo quimotripsina 3, una proteasa tipo papaína, una helicasa, glucoproteínas y proteínas accesorias (19). Este nuevo coronavirus presenta una morfología elíptica o redonda con un diámetro de 60 a 140

nm, aunque puede ser pleomórfico. El genoma de este virus consiste de 29,891 nucleótidos que codifican para 9,860 aminoácidos (20).

La proteína S es responsable de la unión del virus a las células blanco, por lo que la distribución de receptores permisivos a la interacción la proteína S definirá el tropismo del virus y el rango de huéspedes susceptibles (21,22). La proteína S consiste en dos subunidades: la S1 que se encuentra en el extremo amino terminal y provee el sitio de unión al receptor y S2 que se encuentra en el extremo carboxilo, encargado de la fusión de las membranas (23). Las subunidades son escindidas por proteasas celulares que son miembros de la familia de las catepsinas y de las proteasas serina 2 transmembranales (TMPRSS2 por sus siglas en inglés) (24).

La proteína E de envoltura viral es una proteína integral de membrana que tiene un extremo amino terminal y un dominio transmembranal alfa hélice y un dominio hidrofílico en su extremo carboxilo (25,26). Esta proteína tiene funciones relacionadas con el ensamblaje y la liberación del virus (27).

La proteína M es una glicoproteína transmembranal tipo III, está compuesta por un dominio amino terminal fuera de la membrana del virión, tres dominios transmembranales y un dominio carboxilo que se encuentra dentro de la partícula viral (28). La función de esta proteína, junto con la proteína E, se ha asociado al ensamblaje de las partículas virales (29,30).

Por otro lado, las proteínas no estructurales tienen diversas funciones involucradas con el proceso de la replicación del virus (Tabla 1). Las proteínas nsp 3, 4 y 6 participan en el rearrreglo de las membranas celulares para el establecimiento de complejos de replicación y transcripción, también llamados organelos de replicación (31). La síntesis de estas proteínas no estructurales está involucrada en la formación de vesículas de doble membrana, que son estructuras características de las células infectadas (32). Los complejos de replicación permiten a los virus concentrar a las proteínas virales en un microambiente, para así excluir factores del huésped que pudieran competir por los recursos que utilizará el virus, así como separar los intermediarios de la replicación de sensores de inmunidad innata como son: la proteína asociada a la diferenciación de melanoma 5 (MDA-5 por sus siglas en inglés) (33) y el receptor tipo Toll 7 (TLR-7 por sus siglas en inglés) (34). En este sentido, se sabe que

algunas proteínas nsp presentan funciones involucradas en la evasión de la respuesta del sistema inmune (35).

Tabla 1. Proteínas no estructurales de SARS-CoV-1 y 2

Proteína	Función
nsp1	Inhibe la traducción de los mRNA celulares (36).
nsp2	Interactúa con factores del huésped, como prohibitina 1 y 2, modificando el ambiente intracelular (37).
nsp3	Proteasa tipo papaína que procesa a la poliproteína para generar nsp1, nsp2 y nsp3 (38).
nsp4	Participa junto con nsp3 en el ensamblaje de las vesículas de doble membrana (39).
nsp5	Escinde el polipéptido para generar nsp4 a nsp16 (40).
nsp6	Induce la formación de vesículas de doble membrana, junto con nsp3 y nsp4 (41).
nsp7	Cofactor junto con nsp8 para la polimerasa de RNA dependiente de RNA (42).
nsp8	Cofactor junto con nsp7 para la polimerasa de RNA dependiente de RNA (43).
nsp9	Participa en la replicación viral al unirse a RNA de cadena sencilla (43).
nsp10	Interactúa con nsp 14 y nsp16 para estimular su actividad enzimática (43).
nsp11	No se ha descrito una función para esta proteína (43).
nsp12	Polimerasa de RNA dependiente de RNA (43).
nsp13	Helicasa de DNA y RNA de doble cadena, además participa en la formación de la caperuza 5' en el mRNA viral (44).
nsp14	Exorribonucleasa 3'-5' y metiltransferasa N7 guanina (43).
nsp15	Endorribonucleasa involucrada en evadir la detección de sensores de RNA de doble cadena (45).
nsp16	2'-O-metiltransferasa activada por nsp10 para la formación de la caperuza 5' en el mRNA viral (43).

1.2. Ciclo viral de SARS-CoV-2

El ciclo viral, para SARS-CoV-2, inicia con la unión de la proteína S al receptor humano ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) presente en células epiteliales nasales, células secretoras y ciliadas del tracto respiratorio (Figura 3) (46). Esta proteína cataliza la escisión de la angiotensina I en angiotensina 1-9 y angiotensina II en la proteína vasodilatadora angiotensina 1-7 (47). Es una proteína ampliamente expresada en distintos órganos y participa en la regulación de la función renal y cardiovascular (48). En la proteína ACE2, los residuos de la primera alfa hélice, la lisina 353, junto con residuos proximales al extremo amino terminal de la hoja beta 5, son los sitios responsables de establecer la unión con la proteína S (49). La interacción entre la proteína S y ACE2, es mediada por el dominio de unión al receptor (RBD por sus siglas en inglés) presente en la subunidad S1 (50,51). Después de que esta unión ocurre, se induce la escisión de S1 y S2 en ACE2, esta escisión puede ser mediada por la actividad de la proteasa TMPRSS2, lo cual favorece la fusión de la membrana viral con la membrana celular (52,53).

Posteriormente el genoma viral se libera dentro de la célula. El genoma es traducido directamente en forma de las poliproteínas pp1a y pp1b, las cuales son escindidas posteriormente por las proteasas virales: proteasa tipo papaína y proteasa tipo 3C. En conjunto, estas proteasas participan en la formación de proteínas no estructurales como la helicasa y la polimerasa de RNA (54). La polimerasa produce una serie de transcritos subgenómicos por medio de un proceso de transcripción discontinua. La replicación de RNA requiere de secuencias que actúen en cis para regular la transcripción (55).

Finalmente se traducen las proteínas estructurales, que en conjunto con el RNA genómico, serán ensamblados en forma de partículas virales (56–58). Las proteínas virales S, E y M se encuentran en el retículo endoplásmico y la vía secretora ayuda a estas proteínas a movilizarse hacia el compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (ERGIC) (59). Las copias del genoma viral se asocian con la proteína N y se envuelven en las membranas en ERGIC que tienen embebidas a las proteínas estructurales: S, M y E, lo que permite la maduración de los viriones (60).

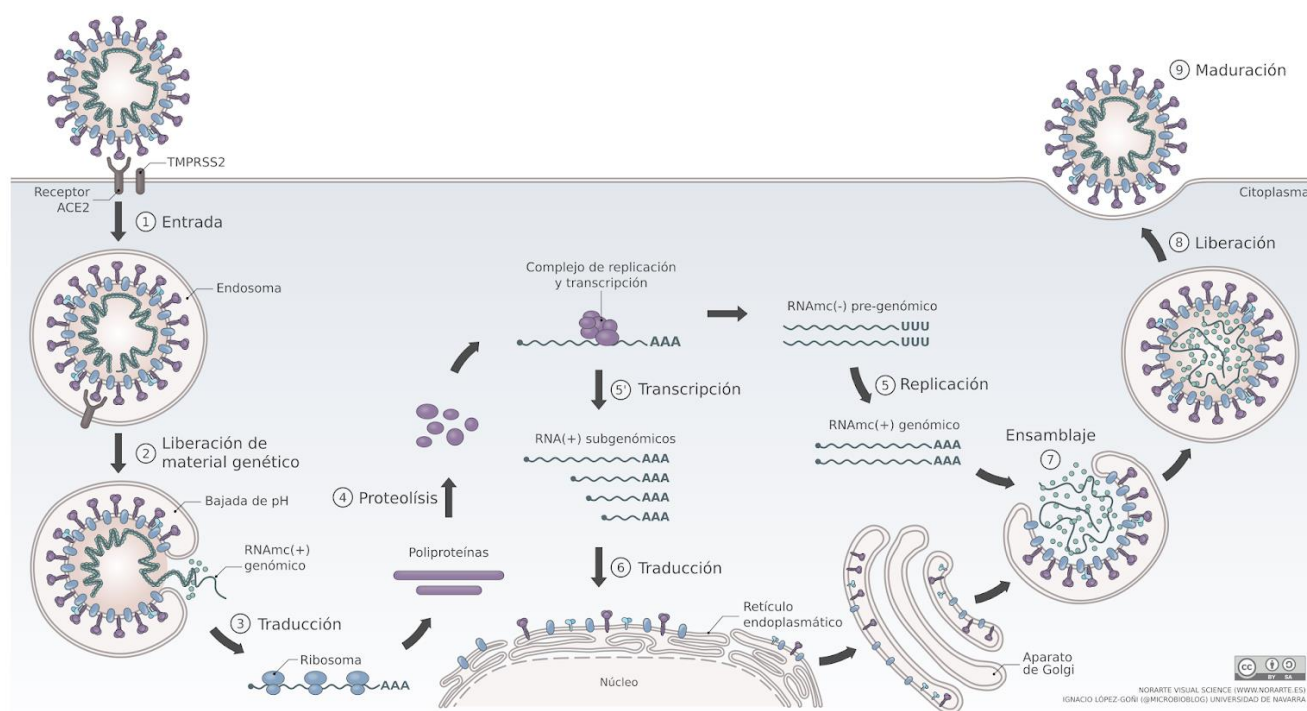


Figura 3. Ciclo de replicación viral de SARS-CoV-2.

1.3. Mecanismos moleculares de patogénesis por SARS-CoV-2

El virus SARS-CoV-2 infecta a las vías respiratorias bajas, principalmente a las células epiteliales alveolares, también conocidas como neumocitos tipo II (61); debido a la alta expresión de ACE2 que estas células presentan, este tipo celular es uno de los principales blancos de infección por este virus (62). La proteína ACE2 permite la homeostasis de los fluidos involucrados en el tejido pulmonar, por lo que con la infección de los neumocitos tipo II, ocurre una pérdida del intercambio de aire, así como una fuga de fluidos dentro de los pulmones (63,64).

Los efectos patogénicos de los coronavirus dependen principalmente de los mecanismos mediados por el sistema inmune innato y adaptativo (65). Se considera como respuesta inmune innata aquella que participa de forma inespecífica ante una infección, mientras que la respuesta adaptativa se monta en específico contra el patógeno involucrado en la infección (66). Por otro lado, los efectos patogénicos observados a nivel celular en la infección por coronavirus son: lisis, apoptosis y formación de sincitios (67). En específico, la formación de los complejos de replicación viral anteriormente mencionados, conduce a la pérdida de la estructura del aparato de Golgi, lo cual tiene efectos citopáticos visibles (68).

Uno de los mecanismos propuestos de patogénesis por SARS-CoV-2 es la llamada tormenta de citocinas, que es el resultado de la activación de múltiples células inmunes, con la consecuente liberación de citocinas proinflamatorias: IL-6, IL-1, TNF- α , MCP1, entre otras (69). En el caso de COVID-19 esta tormenta de citocinas se presenta desde una etapa temprana en el desarrollo de la enfermedad y ésta podría estar siendo iniciada por la población de macrófagos pulmonares (70). Se estima que tras la activación de las células inmunitarias se produce la secreción de citocinas y quimiocinas inflamatorias en las células endoteliales vasculares de los pulmones (71).

Se ha reportado que en el plasma de pacientes hospitalizados con COVID-19 se encuentran las siguientes citocinas incrementadas en comparación con sujetos controles sanos: la interleucina 1 beta (IL1- β), el antagonista del receptor de interleucina 1 (IL1RA), interleucina 7 (IL-7), la interleucina 8 (IL-8), la interleucina 9 (IL-9), la interleucina 10 (IL-10), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF2 básico), el factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GMCSF), el interferón gamma (IFN- γ), la proteína inducida por interferón gamma 10 (IP10), la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1), la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1 α), la proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1 β), la subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFB), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFA). Más aún, en los casos de COVID-19 que ingresaron a unidad de cuidados intensivos se observaron niveles incrementados de las siguientes citocinas, con respecto a los pacientes con COVID-19 que no ingresaron a la unidad de cuidados intensivos: IL-2, IL-7, IL-10, GCSF, IP10,

MCP1, MIP1 α y TNF- α (2) (Tabla 2). Por otro lado, también se ha encontrado que en los pacientes con COVID-19, la población de los linfocitos T CD3+ se encuentra disminuida y esto correlaciona negativamente con la presencia de la IL-6 y la IL-8 en el suero de los pacientes, particularmente se ha reportado que la cinética de la IL-6 se puede relacionar con la severidad de la enfermedad (72).

Tabla 2. Citocinas reportadas en casos de COVID-19 y su función normal		
Citocina	Función	Referencias
FGF2 básico	Regula la sobrevivencia, división, migración y diferenciación celular. Induce la expresión de genes relacionados a inflamación en células endoteliales.	(73,74)
GCSF	Controla la producción, diferenciación y función de granulocitos y monocitos.	(75)
GMCSF	Estimula el crecimiento y diferenciación de precursores hematopoyéticos de granulocitos, macrófagos, eosinófilos y eritrocitos.	(76)
IFN- α	Tiene propiedades antivirales al estimular la expresión de genes que participan en respuesta inmune innata y adaptativa.	(77,78)
IFN- γ	Activa células efectoras inmunes y favorece la presentación de antígeno en infecciones virales.	(79,80)
IL-10	Actúa en distintas células inmunes limitando el daño al tejido causado por inflamación	(81)
IL-13	Inhibe la producción de citocinas proinflamatorias.	(82)
IL1RA	Inhibe la actividad de la IL-1, al unirse a su receptor IL1R1.	(83)
IL1- β	Induce la migración y activación de neutrófilos, la activación de linfocitos B y T, así como, la proliferación de fibroblastos.	(84,85)
IL-2	Se requiere para la proliferación de linfocitos T.	(86)
IL-4	Activa a linfocitos B.	(87)
IL-6	Es un potente inductor de inflamación.	(88)
IL-7	Estimula la proliferación de progenitores linfoides.	(89)
IL-8	Quimioatrayente de neutrófilos, basófilos y linfocitos T.	(90)

IL-9	Es un factor de crecimiento para linfocitos T, B y mastocitos.	(91)
IP10	Quimiocina con propiedades proinflamatorias.	(92)
MCP1	Quimioatrayente de monocitos y basófilos.	(93,94)
MIP1 α	Quimiocina con propiedades proinflamatorias.	(95)
MIP1 β	Quimiocina con propiedades proinflamatorias.	(95)
PDGFB	Factor de crecimiento que regula la proliferación, migración y sobrevivencia de pericitos y células vasculares de músculo liso.	(96)
TNF- α	Es un fuerte pirógeno proinflamatorio que inhibe la función de linfocitos T regulatorios.	(97)
VEGFA	Participa en la angiogénesis y crecimiento celular del endotelio.	(98)

La inmunopatología propuesta, de acuerdo a lo reportado para SARS-CoV y los virus de RNA, en general, se debe a que con la entrada del virus se induce la estimulación de la respuesta inmune a través de receptores tipo Toll (TLR) como el TLR4 que reconoce a la proteína S, con ayuda de la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88 por sus siglas en inglés) que participa como proteína adaptadora y permite la transducción de la señal (99). La interacción entre estas proteínas permite la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B por sus siglas en inglés) y la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés) para producir proteínas pro inflamatorias (100). Además, ocurre la activación de otros receptores, como TLR-3 que es un receptor endosomal, que reconoce el RNA de doble cadena del coronavirus y recluta a la proteína adaptadora TRIF. Esta última, activa a las proteínas IRF3 y NF- κ B para inducir la secreción de citocinas pro inflamatorias y de respuesta antiviral como interferón α (IFN- α) y TNF- β (101–103). El IFN- α forma complejos con su receptor (IFNAR) y de esta forma activa la vía de señalización JAK-STAT, que tiene como resultado la transcripción de genes estimulados por interferón (ISG por sus siglas en inglés) que en conjunto inhiben la replicación viral (101).

Por otro lado, previamente se ha reportado que algunos coronavirus presentan mecanismos para evadir la respuesta inmunitaria. Al respecto se sabe que, nsp1 inactiva la maquinaria

traduccional y de esta forma suprime el papel de la vía de IFN Tipo I, además de que lleva a cabo la degradación de RNA de la célula huésped y la inhibición de la fosforilación de STAT1. Lo anterior, produce en conjunto, la inhibición de la respuesta del IFN Tipo I, de modo que se promueve la replicación y la diseminación viral desde una etapa temprana de la enfermedad (101,102,104). En el caso particular de SARS-CoV-1, se sabe que los productos génicos obtenidos del ORF3B, ORF6 y N, son antagonistas de la respuesta de IFN Tipo I, cabe señalar que los productos de esos marcos de lectura son las proteínas nsp3b, nsp6 y la proteína estructural N (105,106). Además, se ha encontrado que la proteína nsp1 degrada el mRNA de la célula huésped (107), al unirse a la subunidad 40s del ribosoma e inducir el corte de transcritos que carecen de una secuencia líder 5' presente en los transcritos virales, de esta forma se inhibe la síntesis proteica celular (108). Adicionalmente se sabe que en la infección con SARS-CoV-1 se produce una secreción de citocinas que conlleva a una respuesta tardía de IFN Tipo I, lo que se caracteriza por un reclutamiento retrasado de monocitos y macrófagos inflamatorios (109).

En el caso de SARS-CoV-2 se ha reportado que el desarrollo de la patogénesis es similar a lo encontrado en SARS-CoV-1. Estudios realizados con SARS-CoV-2 demuestran que la infección por este virus, en modelos experimentales *in vivo*, *in vitro* y a partir de muestras de pacientes, está asociada a la producción de una gran cantidad de citocinas, a partir del día 3 después de la infección y que ésta no se detiene hasta la eliminación del virus. Específicamente, se ha detectado un incremento de quimiocinas asociadas a monocitos, tales como: CCL2 y CCL8; así como, bajos niveles de IFN Tipo I y III (110).

1.4. Presentación clínica

Los síntomas de la infección aparecen después de un periodo de incubación de aproximadamente 5.2 días (111). El curso de la enfermedad es variable entre los pacientes, en algunos casos inicia con síntomas leves y posteriormente se presenta una neumonía alrededor del día 9 de la enfermedad (112). El periodo de tiempo desde los síntomas de la enfermedad hasta la muerte varía de 6 a 41 días con una mediana de 14 días (113). Este periodo dependerá de la edad del paciente y del estado de su sistema inmune. Entre pacientes

mayores a 70 años de edad este periodo es más corto, en comparación con aquellos pacientes menores a los 70 años de edad (113).

En general, se habla de cinco posibles cuadros clínicos de COVID-19: asintomáticos, leves, moderados, severos y críticos (72). Los casos asintomáticos corresponden a personas infectadas con SARS-CoV-2 que no presentan síntomas, mientras que los casos leves, moderados severos y críticos se presentan en pacientes infectados con SARS-CoV-2 que sí presentan síntomas (114). Los casos leves se caracterizan por presentar fiebre, tos, cambios en el gusto y olfato, sin disnea; mientras que los casos moderados pueden tener adicionalmente evidencia clínica o radiográfica de enfermedad en el tracto respiratorio inferior, tanto los casos leves como los moderados no requieren hospitalización (115). Por otro lado, los casos severos y críticos requieren de hospitalización; los casos severos se caracterizan por presentar una saturación de oxígeno $<94\%$ e infiltración pulmonar $>50\%$ y los casos críticos son aquellos donde ocurre fallo respiratorio, disfunción multiorgánica, entre otras complicaciones que pueden ser fatales (115).

Los síntomas más comunes del inicio de la enfermedad de COVID-19 son: fiebre, dolor de cabeza, hemoptisis, diarrea, disnea y linfopenia (2,13,113,116). Los estudios de imagenología como la tomografía computarizada del pecho, permiten observar características clínicas de una neumonía, en algunos pacientes el cuadro puede empeorar, presentándose entonces un síndrome respiratorio agudo o un daño cardíaco agudo que pueden conducir a la muerte (2). Aunque existen similitudes entre los síntomas que provocan los betacoronavirus, COVID-19 muestra características únicas como la afección de las vías respiratorias bajas (117,118).

1.5. Epidemiología

El 30 de enero de 2020, la OMS nombró a la COVID-19 como emergencia de salud pública de preocupación internacional, posteriormente el 11 de marzo del 2020 fue determinada, por la misma organización, como una pandemia (119). Para el 31 de mayo del 2021, se han reportado 169 597 415 casos confirmados y 3 530 582 muertes a nivel mundial (8). La tasa de letalidad global es de 5.8 %, la cual aumenta en pacientes que pertenecen a la población de adultos mayores y en aquellos pacientes con comorbilidades (120,121).

En México el 28 de febrero se confirmó el primer caso positivo para SARS-CoV-2, de un hombre de 35 años de edad, perteneciente a la Ciudad de México que había viajado recientemente a Italia (122). Posteriormente los casos fueron aumentando, hasta darse las tres fases características de una epidemia. Al 30 de mayo de 2021 en México, se han confirmado 2 412 810 casos y 223 507 defunciones por la enfermedad de COVID-19 (9). Mientras que la tasa de letalidad en México, por COVID-19, se estima en 9.33% (123).

La transmisión de este virus es principalmente por el contacto entre humanos y ocurre a través de gotas producidas cuando una persona infectada estornuda, tose o habla; al inhalar esas gotas, éstas pueden establecerse en los pulmones o en la mucosa nasal o bucal (124). En una cohorte de pacientes positivos a SARS-CoV-2 se midió la carga viral en muestras de saliva orofaríngea y se encontró que la mediana en carga viral era de 5.2 log₁₀, lo cual equivale a 158,489 copias por ml, además de que se reportó que la carga era más alta durante la primera semana después del inicio de los síntomas y posteriormente iba disminuyendo con el tiempo (125,126). La carga viral alta que se detectó en el estudio anterior durante la fase temprana de la enfermedad, sugiere que los pacientes podrían ser más infecciosos durante este periodo y esto puede asociarse a la alta transmisibilidad que ha caracterizado a SARS-CoV-2 (127). Por otro lado, la carga viral podría correlacionarse con la edad de los pacientes, lo cual podría deberse a un bajo nivel de inmunidad en este grupo poblacional y a una alta expresión del receptor ACE2 (128).

1.6. Tratamiento

En los casos de COVID-19 leves y moderados se recomienda la administración de antipiréticos para la fiebre y el dolor, la hidratación y el monitoreo constante de la saturación de oxígeno (129). En los casos que la saturación de oxígeno sea <90% se recomienda la administración de oxígeno suplementario (129).

De todos los antivirales utilizados, hasta el momento sólo el remdesivir ha sido aprobado como uso de emergencia por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA) para el uso en pacientes adultos y pediátricos que requieren hospitalización, debido a distintos estudios clínicos realizados durante el año 2020 que demuestran un periodo de recuperación menor cuando se utiliza este antiviral en comparación cuando sólo se

administra un placebo (130). También se aprobó el uso de emergencia de algunas combinaciones de anticuerpos monoclonales contra SARS-CoV-2, esto en pacientes que tienen riesgo alto de pronóstico de COVID-19 severo (131). Sin embargo, en México, el acceso a estos medicamentos no es una posibilidad para la mayoría de la población.

Recientemente se ha encontrado evidencia de que la dexametasona reduce la mortalidad en pacientes hospitalizados con COVID-19, por lo cual ha sido recomendado su uso a nivel mundial (132). En México, se reporta que el tratamiento experimental que se ha utilizado contra los pacientes con COVID-19 ha sido: cloroquina, hidroxicloroquina, lopinavir/ritonavir, atazanavir/ritonavir, tocilizumab, ivermectina, plasma de pacientes convalecientes, remdesivir, anticoagulantes y dexametasona (133,134).

1.7. Vacunas

Actualmente se cuenta con una serie de vacunas específicas contra SARS-CoV-2 aprobadas por la OMS para uso de emergencia. La primera vacuna en ser aprobada para uso de emergencia fue la vacuna COVID-19 de Pfizer (BNT162b2) el 31 de diciembre del 2020 (135). Otras vacunas aprobadas para uso de emergencia por la OMS son: la vacuna de AstraZeneca/Oxford (ChAdOx1-S/AZD1222) y la vacuna Ad26.COV2.S de Johnson & Johnson (135).

En México, el organismo responsable de la aprobación de vacunas para uso federal es la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (Cofepris), la cual ha autorizado el uso de emergencia de cuatro vacunas contra el virus SARS-CoV-2: la vacuna de Pfizer-BioNTech, la vacuna de AstraZeneca-Universidad Oxford, la vacuna de Bharat Biotech International Limited, COVAXIN y la vacuna de CanSino (136,137). Actualmente en México se encuentran en investigación las vacunas de Janssen y Novavax (136). No obstante, es necesario que haya más tiempo de farmacovigilancia sobre estas vacunas, por lo que se espera que esta información se vaya actualizando conforme se obtiene. Al día 30 de mayo del 2021, se estima que 21.2 millones de personas han recibido vacuna contra COVID-19 en México (138).

Las vacunas desarrolladas contra SARS-CoV-2 están basadas principalmente en la producción de proteínas o fragmentos de proteínas que mimetizan la infección con SARS-

CoV-2 (135). Entre ellas están las vacunas con vectores virales que son el vehículo para internalizar en las células RNA o DNA que permite la síntesis de proteínas provenientes de SARS-CoV-2 (139). Sin embargo, también están en desarrollo vacunas que son virus atenuados o inactivados de SARS-CoV-2 (135).

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se desconoce qué factores están involucrados en producir cuadros clínicos más severos que otros en COVID-19, sin embargo, una de las hipótesis es la respuesta inflamatoria exacerbada que provoca la enfermedad (69). Se sabe por estudios post mórtem, que la gravedad de la enfermedad se ha relacionado con altos niveles de citocinas circulantes, linfopenia e infiltración de células mononucleares en los pulmones, el corazón (63), los ganglios linfáticos (140) y los riñones (141). Adicionalmente, se sabe que en los pacientes con un cuadro clínico severo, un 80% de las células totales obtenidas del fluido bronco alveolar son células fagocíticas mononucleares, mientras que en el fluido bronco alveolar de los casos clínicos leves y los datos de secuenciación de tejido pulmonar de controles sanos, sólo se encontró que esta población de células representaba un 60% y un 40% respectivamente (142).

Para entender qué poblaciones celulares son responsables de la tormenta de citocinas se han llevado a cabo diversos estudios con cohortes de pacientes y muestras de sangre periférica. Algunos de estos estudios han encontrado que en pacientes con COVID-19 ocurre una activación de linfocitos T CD4+ hacia células T cooperadoras (Th) de tipo 1, así como una inducción en la producción de monocitos inflamatorios CD14+CD16+ que expresan una alta cantidad de IL-6 (143). Se ha encontrado que los monocitos de pacientes con COVID-19 son más grandes en tamaño y además expresan CD11b+, CD14, CD16, CD68, CD80+, CD163 y CD206+; adicionalmente secretan IL-6, IL-10 y TNF- α , en comparación con los controles sanos (144). Sin embargo, estos estudios muestran la producción de citocinas y la expresión de marcadores en células inmunitarias sólo a un tiempo determinado de la enfermedad por COVID-19, por lo que se desconoce la dinámica de las citocinas y de las células inmunitarias involucradas en el progreso de la inmunopatología por COVID-19. Por todo esto, es de nuestro interés estudiar qué genes de la respuesta inmune innata antiviral expresan las células mononucleares de sangre periférica de pacientes positivos a SARS-CoV-2, asimismo, qué citocinas se expresan en circulación durante la evolución de la enfermedad. De esta forma será posible sugerir potenciales blancos terapéuticos, así como también, tener indicios para sugerir el pronóstico de los pacientes de COVID-19.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El perfil de expresión de genes de respuesta antiviral en las células mononucleares de sangre periférica y citocinas en el suero de pacientes con SARS-CoV-2 se asocia al pronóstico de recuperación.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la expresión de los marcadores de la respuesta antiviral en pacientes con SARS-CoV-2 y su relación con la evolución clínica.

4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la expresión de los marcadores de la respuesta antiviral en células mononucleares de sangre periférica de pacientes infectados con SARS-CoV-2.
2. Evaluar el perfil sérico de citocinas relacionadas al proceso inflamatorio en pacientes con SARS-CoV-2.
3. Correlacionar la expresión de citocinas en células mononucleares y en suero con la evolución clínica de los pacientes incluidos en el estudio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.1 Materiales

5.1.1 Reactivos

Obtención de PBMC y suero

- Histopaque-1077 Cat. 10771 (Sigma-Aldrich)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Cat. 11320033 (Gibco)
- Solución de antibiótico-penicilina-estreptomicina (100UI/ml de penicilina G de sodio y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina) Cat. 15140122 (Gibco)
- Suero fetal bovino (SFB) Cat. 16000044 (Gibco)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) Cat. 561865 (Sigma-Aldrich)
- Buffer de fosfatos salino (PBS) 1X pH 7.4

Extracción de RNA

- RNeasy Mini Kit Cat. 74104 (QIAGEN)
- β-mercaptoetanol Cat. M3148 (Sigma-Aldrich)
- RNase-Free DNase Set Cat. 79254 (QIAGEN)
- QIAshredder Cat. 78656 (QIAGEN)
- Etanol 70% grado Biología Molecular
- Agua tratada con DEPC 0.1%

Control de calidad RT-qPCR para RNasa P

- 2xRx (Invitrogen)
- MgSO₄ 5 mM (Invitrogen)
- BSA 20 mg/ml (Bio-Rad)

- Primer Forward (Fwd) y Reverse (Rev) para RNasa P (T4 Oligo)
- Sonda de escisión para RNasa P (T4 Oligo)
- Superscript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Cat. 12574018 (Invitrogen)

Retrotranscripción y qPCR

- RT² First Strand Kit Cat. 330404 (QIAGEN)
- RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix Cat. 330523 (QIAGEN)
- RT² Profiler PCR Arrays Antiviral Response Cat. 330231 (QIAGEN)

Inmunoensayos

- MILLIPLEX MAP Kit Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Cat. HCYTOMAG-60K Customized panel HIFNA2-MAG, HCYIFNG-MAG, HCYIL10-MAG, HIL13-MAG, HCYIL1B-MAG, HCYTNFA-MAG, HCYIL8-MAG, HCYIL6-MAG, HIL2-MAG y HIL4-MAG (Millipore)

5.1.3 Equipos

- Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
- Termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems)
- Termociclador Step one plus PCR system (Applied Biosystems)
- Campana de Bioseguridad Tipo II (Nuair)
- Centrífuga con rotor para tubos de 15 ml capacidad de 400 g y 1500 rpm (Thermo Fischer Scientific)
- Pipetor para pipeta serológica (Thermo Fischer Scientific)
- Refrigerador 4°C (Supermatic)
- Congelador -20°C (Kenmore)

- Luminex 200 (Millipore)
- Ultracongelador -70 a -80°C (Nuaire)

5.2. Métodos

5.2.1 Estrategia general

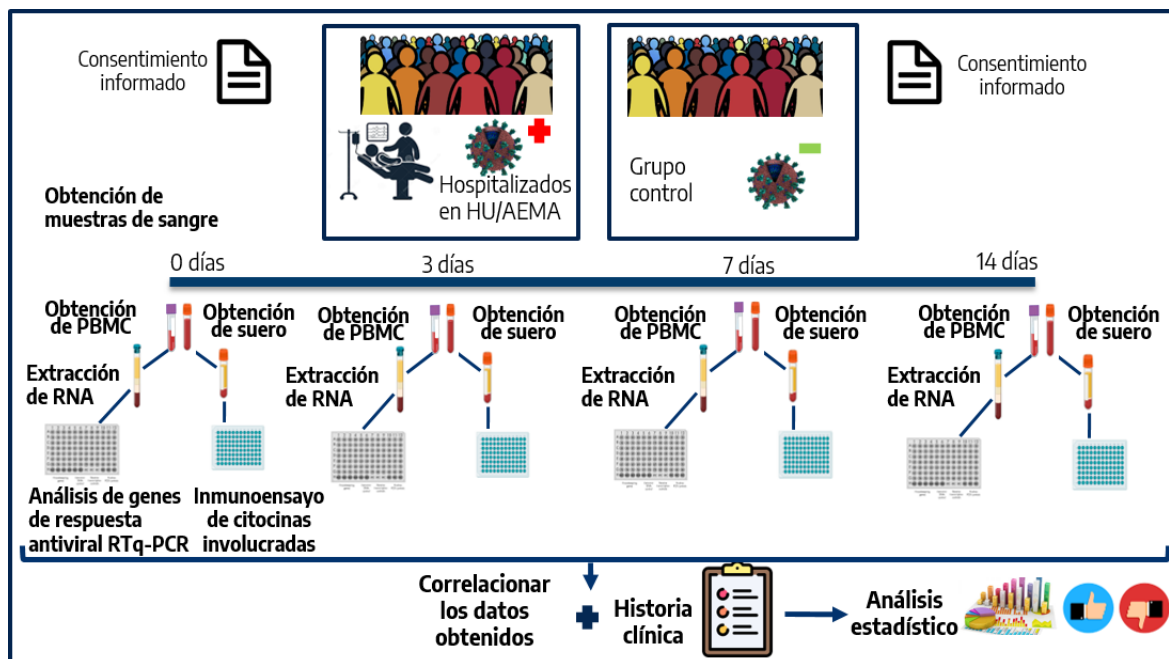


Figura 4. Estrategia general.

5.2.2 Obtención de las células mononucleares de sangre periférica y suero

De los sujetos controles sin COVID-19 y pacientes con COVID-19 hospitalizados, se obtuvieron muestras de sangre en tubo BD Vacutainer con EDTA K2 y en tubo BD Vacutainer para suero. Las muestras en tubo BD Vacutainer para suero se centrifugaron a 3,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente, se colectó el suero y se almacenó a -70°C. Para obtener las células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) se añadieron 4 ml de Histopaque a un tubo cónico, posteriormente se depositaron 4ml de sangre sobre el Histopaque, de forma lenta por la pared, inclinando el tubo 45°. Se centrifugó inmediatamente a 400 g por 30 min a temperatura ambiente sin desaceleración. Posteriormente, para recuperar las PBMC, se tomó el halo blanco que se encuentra debajo

del plasma y arriba del Histopaque. Las PBMC se depositaron en un tubo nuevo que se aforó a 5ml con PBS 1X. Se centrifugó a 1,500 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Como resultado se obtuvo un botón de células en el fondo del tubo, se decantó el sobrenadante, se resuspendió el botón y se agregaron 5ml de PBS 1X. Se centrifugó a 1,500 rpm por 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml de medio de congelación (Medio DMEM, Solución de antibiótico 1% y SFB 20%) y en 1ml de medio DMSO (Medio DMEM, Solución de antibiótico 1%, SFB 20%, DMSO 20%). Se hicieron dos alícuotas de 1 ml por cada muestra y éstas se almacenaron dentro de un contenedor Mr. Frosty con isopropanol a -70°C, posterior a 2 h como mínimo los crioviales fueron retirados de este contenedor para almacenarse directamente a -70°C.

5.2.3 Extracción de RNA

Las alícuotas de PBMC fueron descongeladas a 37°C en baño maría, posteriormente se transfirió el contenido a un tubo de 1.5 ml, este tubo se centrifugó 5 s a 13000 rpm a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante con puntillas y a partir del sedimento celular se extrajo el RNA total utilizando las columnas RNeasy Mini Kit Cat. 74104 (QIAGEN) y QIAshredder Cat. 78656 (QIAGEN), de acuerdo con lo descrito a continuación. Se añadieron 350 µl de Buffer RLT más 3.5 µl de β-mercaptoetanol a cada microtubo con el sedimento celular, se utilizó el vórtex y se resuspendió con la micropipeta. Posteriormente, se transfirió el volumen a una columna de QIAshredder y se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min. Después se añadió al lisado un volumen igual de etanol al 70% y se mezcló por pipeteo. Se transfirieron 700 µl de la muestra a una columna RNeasy dentro de un tubo colector de 2ml y se centrifugó por 15s a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se reutilizó el tubo colector. Se añadieron 250 µl de Buffer RW1 a la columna y se centrifugó 15s a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se reutilizó el tubo. Posteriormente, en un microtubo se añadieron 10 µl de DNase I stock solution a 70 µl de Buffer RDD (RNase-Free DNase Set Cat. 79254 (QIAGEN)), se mezcló el tubo por inversión y se le dio un spin en la centrífuga. Se añadió la mezcla de DNasa preparada previamente a la columna y se incubó a temperatura ambiente (20 a 30°C) por 15 min. Después se agregaron 350 µl de Buffer RW1 a la columna y se centrifugó 15 s a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se reutilizó el tubo. Se

añadieron 500 µl de Buffer RPE y se centrifugó 15s a 13000 rpm, de nueva cuenta se descartó el sobrenadante y se reutilizó el tubo colector. A continuación, se añadieron 500 µl de Buffer RPE y se centrifugó 2 min a 13,000 rpm. Se colocó la columna en un tubo colector nuevo de 2 ml y se centrifugó a máxima velocidad por 1 min. Se colocó la columna en un tubo colector con tapa de 1.5 ml y se le añadieron 30 µl de agua libre de RNasas tibia en baño maría a 37°C, se incubó 5 min para posteriormente centrifugar 1 min a 13,000 rpm. Finalmente se cuantificó en Nanodrop la concentración y calidad del RNA obtenido.

5.2.4 Control de calidad RT-qPCR para RNasa P

El RNA proveniente de PBMC de pacientes fue sometido a RT-qPCR para la amplificación del gen endógeno de la RNasa P. Los pares de primers utilizados presentaban las siguientes secuencias 5'-3': AGATTTGGACCTGCGAGCG (como primer forward), GAGCGGCTGTCTCCACAAGT (como primer reverse) y (FAM)TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG (como sonda de hidrólisis específica) bajo las condiciones de reacción que se muestran a continuación.

Tabla 3. Condiciones de RT-qPCR para RNasa P

Reactivo	Por reacción
H ₂ O	6.25 µl
2xRx	12.5 µl
MgSO ₄ 5mM	0.4 µl
BSA 20 mg/ml	0.1 µl
Primer Fwd RNasa P 10µM	1 µl
Primer Rev RNasa P 10µM	1 µl
Sonda RNasa P 10µM	0.75 µl
Mezcla de enzimas Superscript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase	0.5 µl
RNA	2.5 µl
Volumen final	25 µl

Posteriormente los tubos de reacción se colocaron en el equipo Step One Plus con el siguiente programa: un ciclo de 10 min a 55°C seguido de 3 min a 94°C y 45 ciclos de 10 s a 95°C, seguido de 45 s a 58°C.

5.2.4 Retrotranscripción y qPCR

El RNA obtenido se sometió a retrotranscripción utilizando el kit de síntesis de cDNA RT² First Strand Kit Cat. 330404 (QIAGEN), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se utilizaron 100 ng de RNA para cada reacción de retrotranscripción. Se realizó la mezcla de eliminación de DNA genómico de acuerdo al volumen de RNA necesario, 2 µl Buffer GE y agua libre de nucleasas para tener un volumen final de 10 µl. Posteriormente se realizó la mezcla de retrotranscripción con 4 µl de Buffer BC3 5X, 1 µl DE Control P2, 2 µl de RE3 Reverse Transcriptase Mix y 3 µl de agua libre de nucleasas. Posteriormente se mezclaron las dos soluciones y se incubó a 42°C por 15 min y de inmediato se llevó a 95°C por 5 min en el termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems). Finalmente, se añadieron 91 µl de agua libre de nucleasas y se almacenó el microtubo a -20°C.

Para realizar la qPCR se utilizó el RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix Cat. 330523 (QIAGEN), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se mezclaron 1350 µl de 2x RT² SYBR Green Mastermix, 102 µl del cDNA obtenido en el paso previo y 1248 µl de agua libre de nucleasas. Se mezcló la solución y se dispensaron 25 µl de esta solución en cada pozo de la placa de RT² Profiler PCR Arrays Antiviral Response Cat. 330231 (QIAGEN). Posteriormente se colocó la tapa adhesiva de la placa y se centrifugó 1 min a 1000 g a temperatura ambiente. La placa se colocó entonces en el termociclador Step one plus PCR system (Applied Biosystems) con el siguiente programa: un ciclo de 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 s a 95°C seguido de 1 min a 60°C. Finalmente los datos obtenidos de la amplificación fueron analizados mediante la hoja de datos obtenida en: www.qiagen.com/shop/pcr/primer-sets/rt2-profiler-pcr-arrays/#resources para obtener el $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

5.2.7 Inmunoensayo múltiple

Se realizó una dilución 1:2 de las muestras de sueros provenientes de pacientes (sugerida por el kit), utilizando el Serum Matrix del MILLIPLEX MAP Kit, habiendo reconstituido previamente el Serum Matrix con 1 ml de agua desionizada. Las muestras provenientes de controles se procesaron sin diluir. Después se sonicaron los viales de microesferas por 30 s y se utilizó el vórtex por 1 min. Se añadieron 60 µl de cada vial de microesferas a un Mixing Bottle y se añadieron 3 ml de Bead Diluent, posteriormente se llevó al vórtex. Por otro lado, se reconstituyeron los viales de control de calidad 1 y 2 con 250 µl de agua desionizada. Se invirtió cada vial varias veces para mezclar y posteriormente se utilizó el vórtex. Además, se mezclaron 60 ml de 10x Wash Buffer con 540 ml de agua desionizada. Se reconstituyó el Human Cytokine Standard con 250 µl de agua desionizada para tener la concentración de 10,000 pg/ml y de ahí se realizaron diluciones para obtener los estándares a 2000, 400, 80, 16 y 3.2 pg/ml, siguiendo las indicaciones del fabricante. Después se realizó un lavado con 200 µl de Wash Buffer en cada pozo de la microplaca que contiene el kit, se selló con el adhesivo y se colocó en un agitador por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó la microplaca sobre un soporte de microplacas de magneto que permite que las microesferas se queden fijas en cada pozo, incluso después de decantar tras cada lavado. En el soporte de magneto se dejó reposar la microplaca por 60 s y posteriormente se decantó el contenido en un recipiente, posteriormente se añadieron 25 µl de cada estándar o control en los pozos adecuados + 25 µl de Assay Buffer + 25 µl Serum Matrix + 25 µl de muestra de suero. Se utilizó el vórtex y se añadieron 25 µl de las microesferas previamente mezcladas. Se selló la microplaca con el adhesivo y se incubó en un agitador por 2 h a temperatura ambiente. Al pasar el tiempo de la incubación se colocó la microplaca sobre el soporte de magneto durante 60 s y se removió el contenido de los pozos. Posteriormente, se llevó a cabo un lavado añadiendo 200 µl de Wash Buffer, se dejó reposar la microplaca por 60 s en el soporte de magneto y se removió el contenido. Se repitió el lavado con 200 µl de Wash Buffer, siguiendo las especificaciones previas para posteriormente añadir 25 µl de anticuerpos de detección en cada pozo, se selló nuevamente la microplaca y se incubó en agitación por 1 h a temperatura ambiente. Después se añadieron 25 µl de estreptavidina-ficoeritrina a cada pozo y se selló la microplaca en incubación por 30 min a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados

siguiendo las especificaciones previamente mencionadas y se añadieron 150 µl de Sheath Fluid a cada pozo de la microplaca, se resuspendieron las microesferas en agitación por cinco minutos y se llevó a analizar en el equipo Luminex 200 con el software xPONENT.

5.2.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados utilizando prueba de t de Student, U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, chi cuadrada o correlación, prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas, según fue el caso, utilizando el programa SPSS versión 24.0. Las gráficas fueron realizadas utilizando el programa GraphPad PRISM 6 y Excel 2016. Para el caso de los datos obtenidos de los arreglos de qPCR se utilizó la plataforma RT² Profiler PCR Array Data Analysis versión 3.5. y la hoja de datos para el análisis de arreglos RT² (www.qiagen.com/shop/pcr/primer-sets/rt2-profiler-pcr-arrays/#resources). Se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p fue igual o menor a 0.05.

6. RESULTADOS

6.1 Cohorte de pacientes hospitalizados con COVID-19

Se reclutaron un total de 38 pacientes para el estudio, de los cuales se obtuvieron muestras de sangre para la obtención de PBMC y suero. Sin embargo, no siempre se obtuvieron las dos muestras para cada uno de los cuatro tiempos de hospitalización: día 0, 3, 7 y 14. Una vez finalizado el reclutamiento de pacientes, se seleccionaron 20 pacientes para la evaluación de genes de respuesta antiviral y 24 pacientes para el análisis de citocinas en suero y las variables clínicas recabadas durante el periodo de hospitalización. Las condiciones para seleccionar a los pacientes de la cohorte de estudio fueron que al menos se tuviera el día 0 de hospitalización o día de ingreso. Además, se reclutó a un grupo de sujetos controles sanos los cuales fueron evaluados mediante RT-qPCR contra SARS-CoV-2 y un inmunoensayo para la identificación de anticuerpos IgG e IgM contra SARS-CoV-2 para descartar infección previa o en el presente por este virus. En total se reclutaron muestras de PBMC y suero de 27 sujetos sanos en una sola ocasión. Algunas de las muestras recabadas en cada uno de los grupos no pudieron ser utilizadas para el análisis debido a escasa muestra o problemas en los controles de calidad que llevan a la eliminación de la muestra, sin embargo, el número de muestras analizadas en cada experimento se mencionará en cada tabla o gráfica que represente los datos analizados.

Tabla 4. Datos demográficos de los pacientes del estudio

	N=24	Sobrevivientes (N=11)	Fallecidos (N=13)
Sexo			
Mujeres	10 (41.7%)	6 (54.5%)	4 (30.8%)
Hombres	14 (58.3%)	5 (45.5%)	9 (69.2%)
Edad			
21 a 31	4	3	1
32 a 41	0	0	0
42 a 51	5	3	2
52 a 61	5	3	2
62 a 71	5	2	3
72 a 81	5	0	5

Tabla 5. Datos demográficos de los sujetos controles del estudio

Edad	N=27	
	Mujeres	Hombres
	15 (55.6%)	12 (44.4%)
21 a 31	5	5
32 a 41	3	2
42 a 51	0	1
52 a 61	6	2
62 a 71	1	2
72 a 81	0	2

6.2 Concentración y control de calidad del RNA obtenido a partir de PBMC de la cohorte de pacientes hospitalizados con COVID-19

Para evaluar la expresión de genes de respuesta antiviral en la cohorte de nuestro estudio, se obtuvieron PBMC a partir de la muestra de sangre con anticoagulante, posteriormente se extrajo el RNA total a partir de RNeasy Mini Kit. El mismo procedimiento se siguió con las muestras de PBMC obtenidas de los sujetos controles.

Tabla 6. Concentración y cocientes de calidad obtenidos a partir de las PBMC de la cohorte de pacientes hospitalizados con COVID-19

Muestra	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
1t0	3.9	2.04	0.02
2t0	5	2.69	0.02
2t3	24.4	1.77	0.17
2t7	16.4	2.07	0.04
3t0	57.8	2	0.46
4t0	85.6	2.01	2.69
4t3	188.6	2.07	0.66
4t7	80.5	2.04	1.37
4t14	29.2	1.93	0.53

5t0	3.5	1.63	0.01
5t3	29.3	1.87	0.2
8t0	2.3	2.52	0.03
8t7	11.4	1.81	0.06
8t14	8.2	1.98	0.02
9t0	8.2	1.18	0.19
9t7	5.7	1.86	0.13
9t3	5.7	2.03	0.22
10t0	437.4	2.06	1.78
10t3	415.7	2.06	2.06
10t7	82.5	2.03	1.08
11t0	4.2	2.93	0.1
11t3	6.8	1.31	0.21
11t7	4.1	2.06	0.15
12t0	10.5	1.38	0.29
12t3	14.9	1.98	0.36
12t7	289.4	2.06	1.35
13t0	5.6	1.88	0.53
13t3	12.3	1.91	0.06
13t7	26.8	2.02	0.1
14t0	4.7	2.08	0.02
14t3	12	1.85	0.29
14t7	23.3	1.95	0.96
15t0	8.5	2.45	0.02
15t3	10.1	1.75	0.07
15t7	10.9	2.07	0.12
15t14	37.6	2.08	0.23
16t0	13.5	2.2	0.04
16t3	22	2.04	1.27
18t0	3.7	3.15	0.61
18t7	20.6	2.09	0.43
24t0	4.8	2.33	0.07
24t3	9.5	2.11	0.32
24t7	35.6	2.09	0.1
25t0	6.5	2.76	0.02
25t3	8.4	2.24	0.13
26t0	38.5	2.02	0.57
26t3	67	2.01	0.73

26t7	49.5	2.01	1.37
30t0	17.8	1.96	0.17
30t3	14	2.02	1.53
30t7	6	1.47	0.33
30t10	7	1.2	0.06
30t11	17.2	1.93	0.22
30t14	6.7	1.1	0.05
32t0	5.7	1.71	0.46
32t3	1.8	1.29	0.02
32t6	6.1	1.39	-0.06
32t7	12.3	1.36	0.06

Debido a la obtención de baja concentración de RNA de las muestras y que muchas de ellas no cumplían con la condición sugerida por el protocolo de los arreglos para qPCR RT² Profiler Antiviral Response de tener un cociente 260/230 >1.7, se decidió llevar a cabo un análisis de calidad adicional. Este análisis de calidad consistió en someter a las muestras a un análisis de RT-qPCR para el gen de la ribonucleasa P (RNasa P). Para este análisis se utilizaron distintas cantidades de ng para comprobar que el material genético se encontraba íntegro y permitiría la amplificación de un gen endógeno como lo es el de la RNasa P. Se utilizaron 0.5, 0.8, 12.5, 14.5 15.5, 25, 26.5, 29, 40 y 80 ng de distintas muestras para corroborar si el RNA se encontraba lo suficientemente íntegro para permitir la amplificación, incluso con bajas cantidades de RNA. Las cantidades utilizadas se eligieron tomando en cuenta las condiciones de los arreglos RT² Profiler Antiviral Response, en donde se menciona que el rango de RNA a utilizar es de 25 ng a 5 µg, los cuales posteriormente se dividen en un total de 96 pozos de reacción. A continuación, se muestra una representación gráfica de los valores de Ct obtenidos con las diferentes cantidades de RNA utilizadas en la reacción.

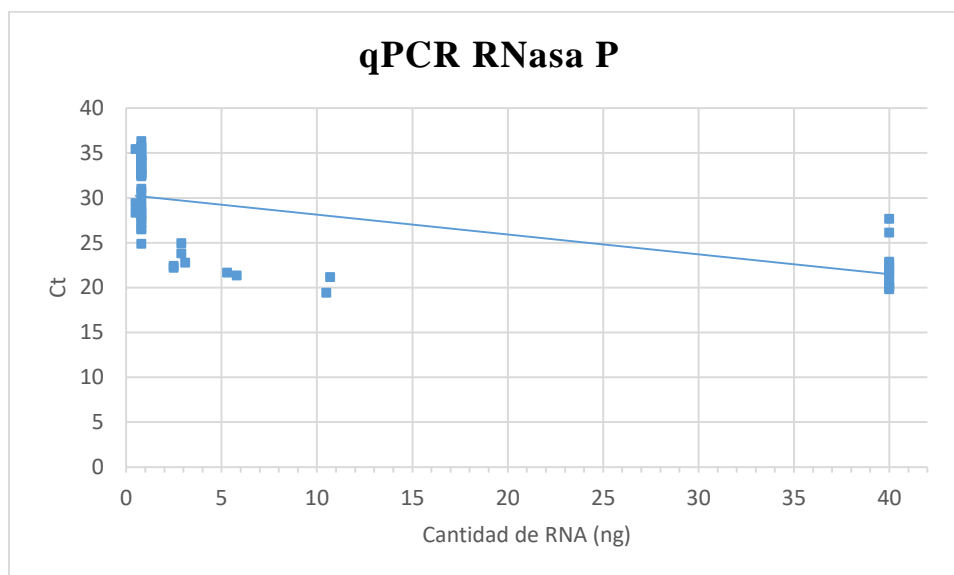


Figura 5. Control de calidad del RNA obtenido a partir de PBMC de pacientes hospitalizados con COVID-19. Se muestra el Ct obtenido para cada cantidad de RNA colocada en la reacción de RT-qPCR para el gen de la RNasa P.

6.3 Evaluación de la expresión diferencial de genes de respuesta antiviral en PBMC de pacientes hospitalizados con COVID-19 en comparación con sujetos controles

Una vez obtenida la evaluación de calidad del RNA se procedió a sintetizar el cDNA de acuerdo a las especificaciones del fabricante de los arreglos RT² Profiler Antiviral Response. Se sometió una muestra por placa de RT² Profiler Antiviral Response, esto se llevó a cabo para 58 muestras correspondientes a los 20 pacientes previamente seleccionados y para 25 sujetos controles que cumplieron con las características óptimas de muestra colectada. Los datos de expresión obtenidos por algunas muestras tuvieron que ser descartados cuando los controles de los genes endógenos no se obtuvieron ya que esto no permitiría realizar la normalización de la expresión génica, por lo tanto, finalmente se consideraron sólo 54 muestras correspondientes a 20 pacientes y 22 muestras correspondientes a 22 controles.

Los arreglos de PCR RT² Profiler Human Antiviral Response comprenden a 84 genes involucrados en la respuesta inmune innata antiviral. En este conjunto de genes se evalúan tres vías de señalización que presentan receptores de reconocimiento de patrón (PRR por sus siglas en inglés), estos son: los receptores TLR, los receptores tipo Nod (NLR por sus siglas

en inglés) y los receptores tipo RIG-I. Las vías de señalización que se relacionan a estos receptores activan la llamada respuesta inmune innata antiviral, en donde participa la expresión de múltiples citocinas pro inflamatorias. En este arreglo también se incluyen genes involucrados en la vía de señalización por IFN Tipo I, por lo que este arreglo permite estudiar las interacciones que ocurren entre vías de señalización de respuesta inmune específicamente en una infección viral. En estos arreglos se tienen además 12 controles de calidad, cinco genes endógenos que permiten la normalización de la expresión de los 84 genes de interés, un control de DNA genómico y triplicados de control de retrotranscripción y polimerasa. Una vez obtenidos los datos de las muestras evaluadas mediante los arreglos de qPCR se realizó la normalización de la expresión entre los pacientes con base en la expresión de un grupo control de un rango de edad ± 11 años, de esta manera se obtuvo el $2^{-\Delta\Delta C_t}$, con lo que se obtuvieron los genes diferencialmente expresados, ya sea sobreexpresados o subexpresados entre pacientes con COVID-19 y sujetos controles, a lo largo del día 0, 3 y 7 de hospitalización. No fue posible incluir en el análisis las muestras obtenidas del día 14 debido a la baja cantidad de muestras que no permite realizar un análisis estadístico confiable. De esta forma se muestran los genes que se mantuvieron sobreexpresados o subexpresados en los pacientes hospitalizados con COVID-19 a lo largo de los tres tiempos analizados, al día 0, 3 y 7 de hospitalización, estableciendo una firma de genes característicos de la enfermedad COVID-19 con un patrón de expresión diferencial en la cohorte de pacientes estudiados.

Tabla 7. Genes diferencialmente expresados en pacientes hospitalizados con COVID-19 en comparación con controles sanos	
Genes sobreexpresados	Genes subexpresados
CASP8	CD86
CCL5	CTSS
CHUK	IRF5
CXCL11	MEFV
FOS	TLR8
IFNA1	TRADD
IFNA2	

IFNB1	
IL12B	
MAP2K1	
MAP2K3	
MAPK14	
MAPK3	
PYDC1	
RELA	
SPP1	
TRAF3	

Se muestran los genes que resultaron significativamente distintos ($p \leq 0.05$) entre el grupo de controles y pacientes hospitalizados con COVID-19 a lo largo de los tres tiempos evaluados. Los datos fueron analizados con Prueba t de Student o U de Mann-Whitney, según fue el caso. N de pacientes=20, N de controles=22.

6.4 Evaluación de la expresión diferencial de genes de respuesta antiviral en PBMC de pacientes hospitalizados sobrevivientes y fallecidos con COVID-19

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis estadístico considerando los datos obtenidos de expresión génica de los 84 genes de interés en respuesta antiviral entre el grupo de pacientes hospitalizados con COVID-19 que sobrevivieron a la enfermedad en comparación con quienes no sobrevivieron. La normalización de la expresión de los genes de cada grupo de pacientes se obtuvo con base en la expresión de un grupo control de un rango de edad ± 11 años, para así conseguir el $2^{-\Delta\Delta C_t}$, con lo que se obtuvieron los genes diferencialmente expresados, ya sea sobreexpresados o subexpresados entre pacientes con COVID-19 sobrevivientes y fallecidos a lo largo del día 0, 3 y 7 de hospitalización. De este análisis se obtuvieron 13 genes que mostraron una diferencia en la expresión entre el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos. Dos genes se encontraron diferencialmente expresados entre sobrevivientes y fallecidos de COVID-19 al día de ingreso hospitalario, mientras que 11 genes se encontraron diferencialmente expresados entre estos grupos al día 7 de hospitalización. No se observaron diferencias en la expresión de los 84 genes de interés entre el grupo de sobrevivientes y fallecidos al día de hospitalización 3 y no se pudo realizar el análisis al día 14, debido al escaso número de muestras en este tiempo, que no permite realizar un análisis estadístico confiable.

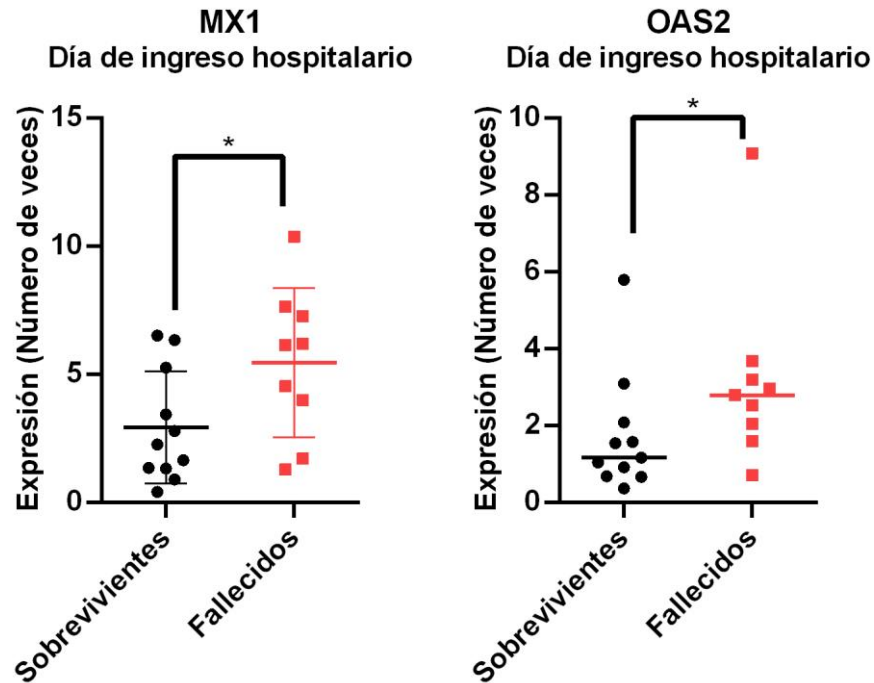


Figura 6. Genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 al ingreso hospitalario. Los valores obtenidos de la normalización de la expresión génica se compararon entre los dos grupos de pacientes con COVID-19. Se muestra media y desviación estándar cuando los datos tuvieron distribución normal y se pudo realizar Prueba t de Student. Se muestra sólo la mediana cuando los datos tuvieron distribución no paramétrica y se realizó Prueba de U de Mann-Whitney, * $p \leq 0.05$, N de sobrevivientes=11, N de fallecidos=9.

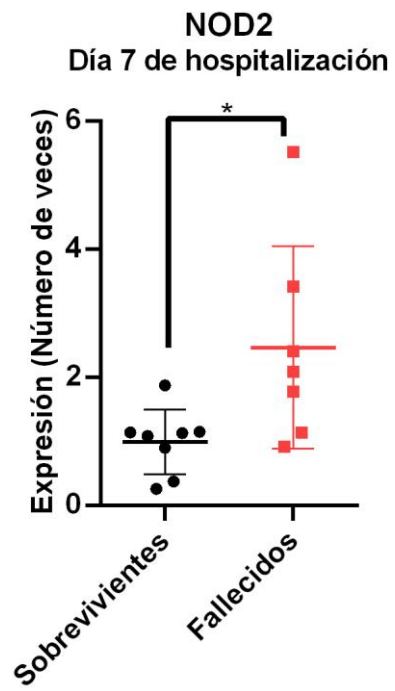
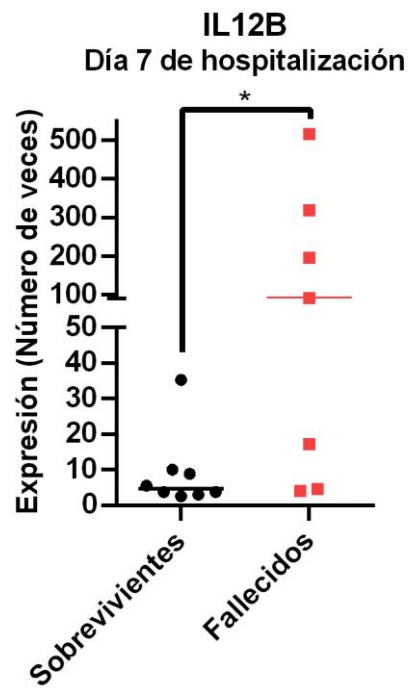
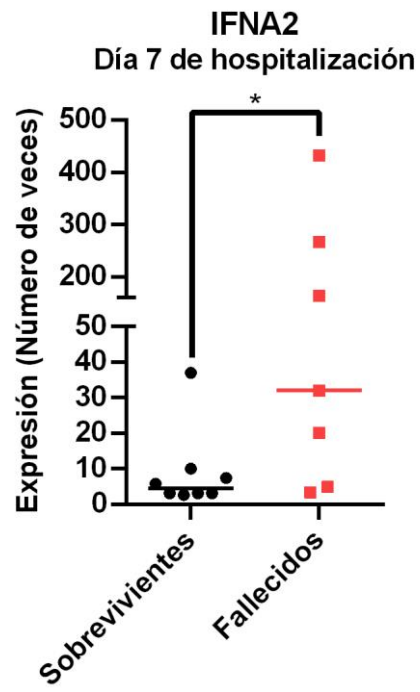
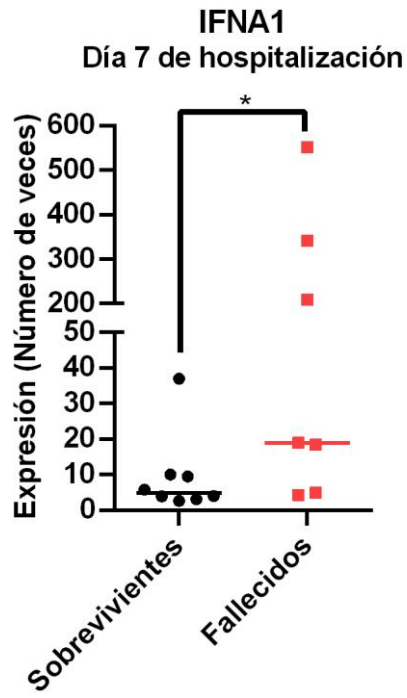
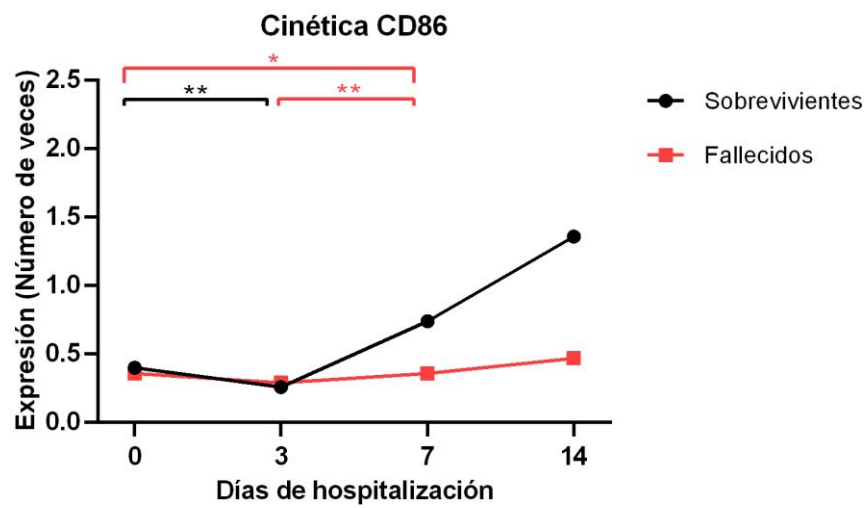
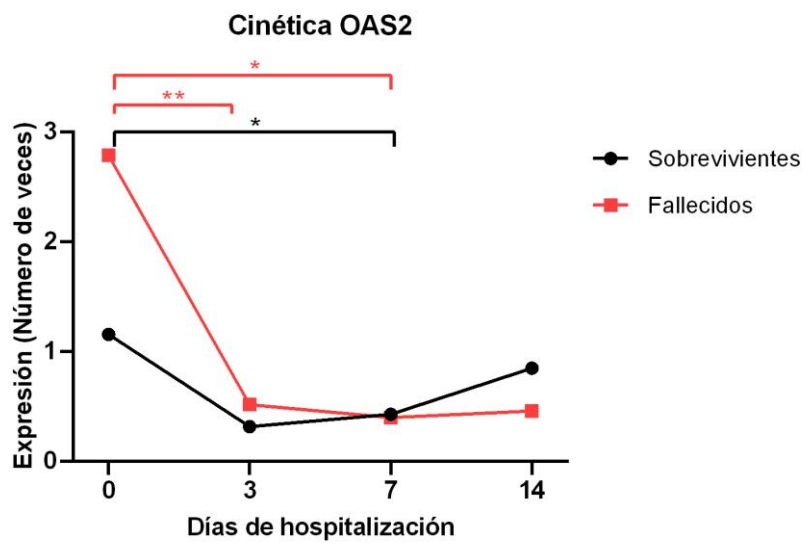
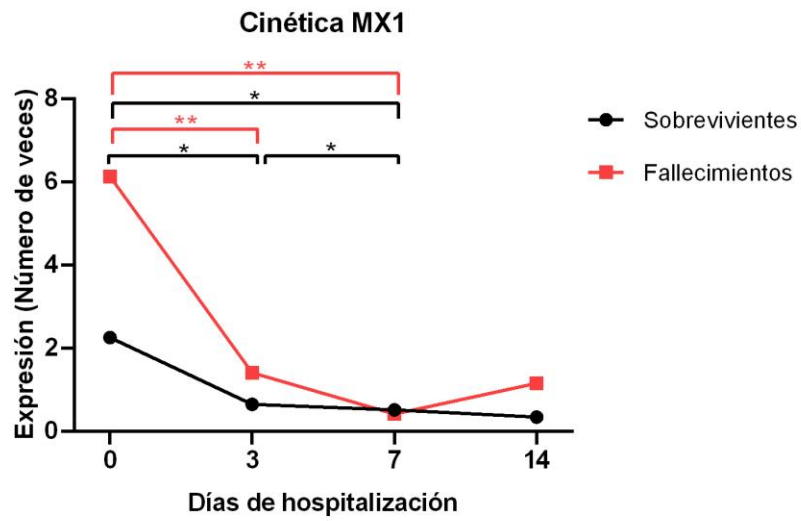
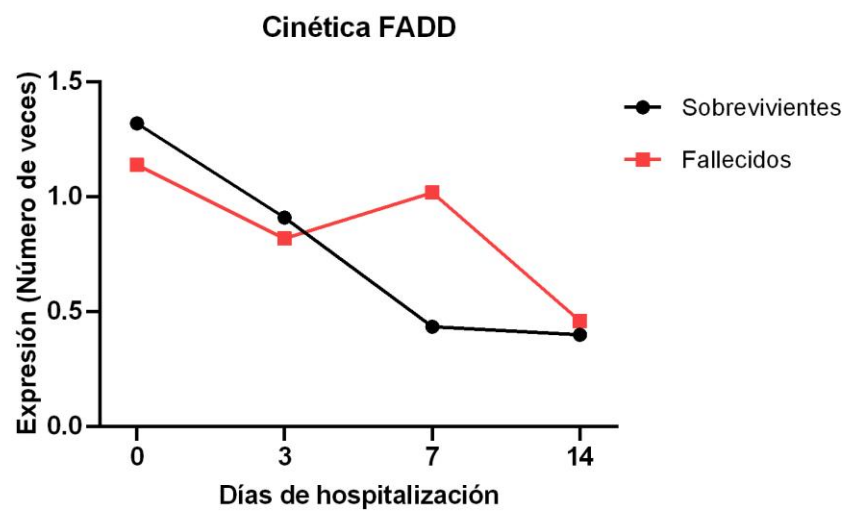
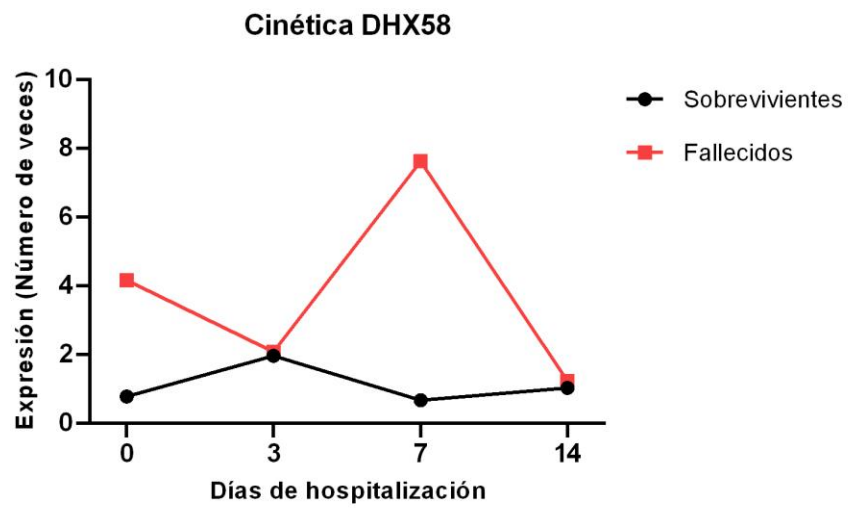
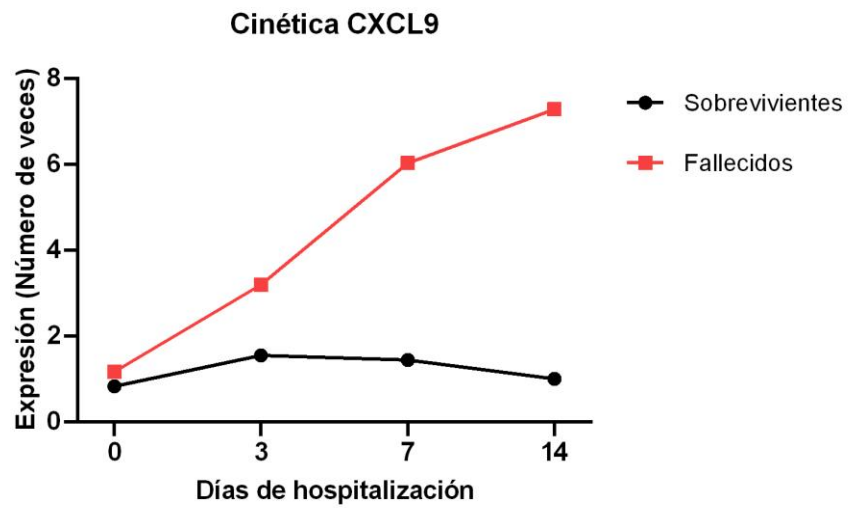


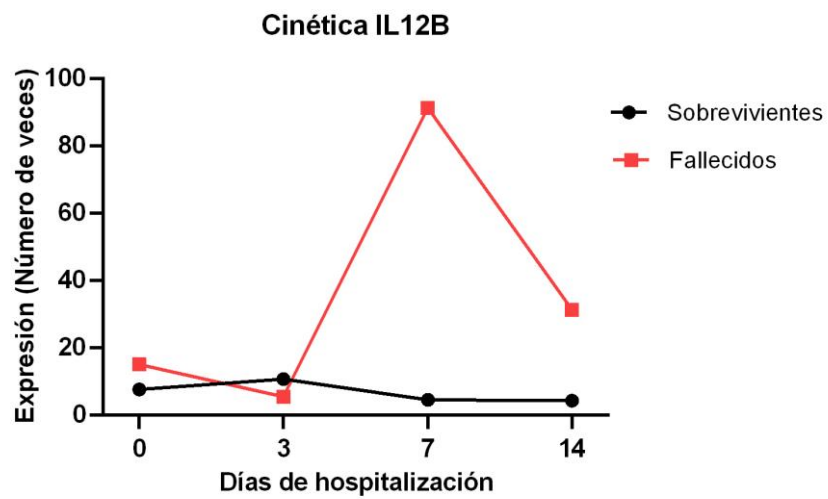
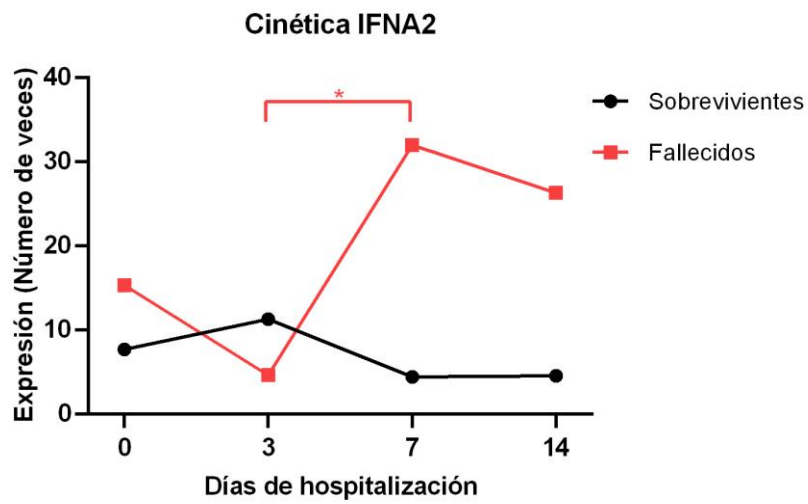
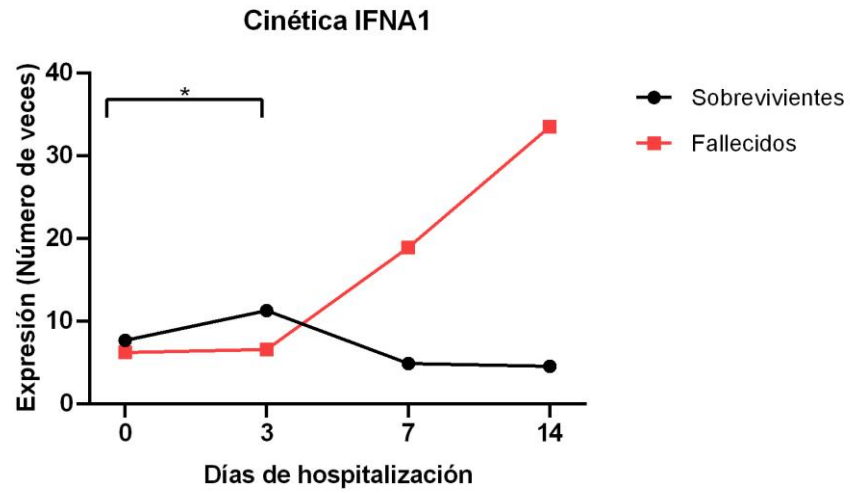
Figura 7. Genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 al día 7 de hospitalización. Los valores obtenidos de la normalización de la expresión génica se compararon entre los dos grupos de pacientes con COVID-19. Se muestra media y desviación estándar cuando los datos tuvieron distribución normal y se pudo realizar Prueba t de Student. Se muestra sólo la mediana cuando los datos tuvieron distribución no paramétrica y se realizó Prueba de U de Mann-Whitney, * $p \leq 0.05$, N de sobrevivientes=7, N de fallecidos=9.

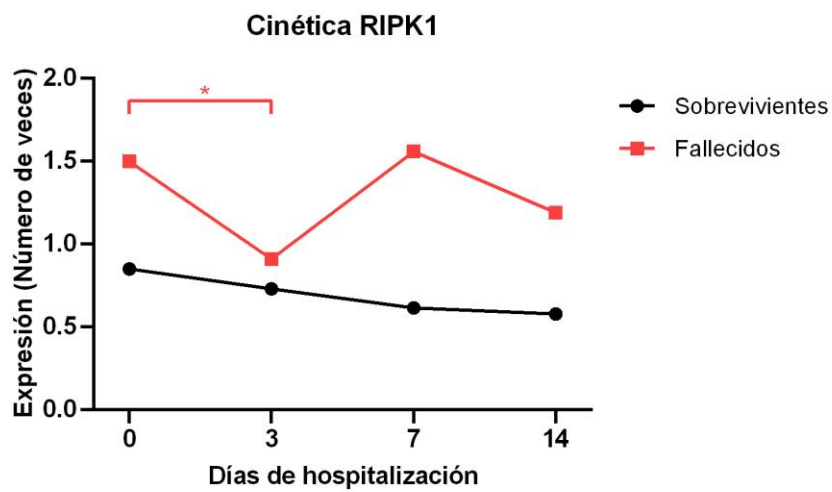
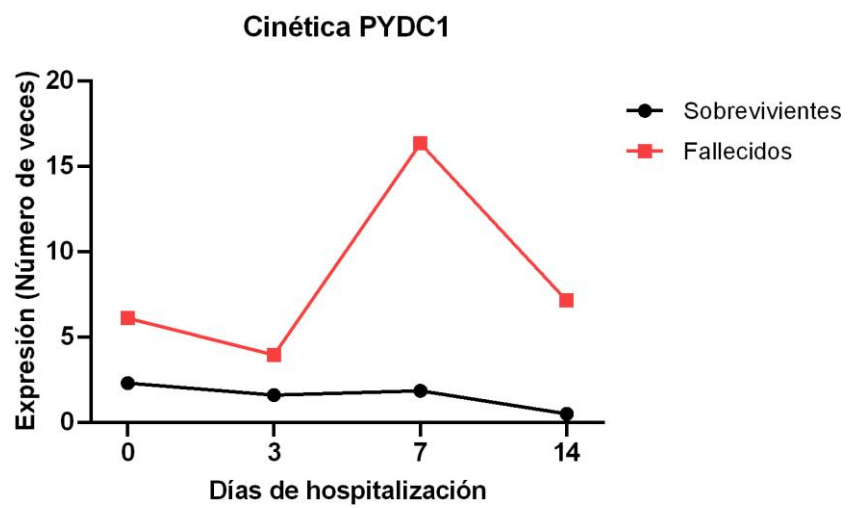
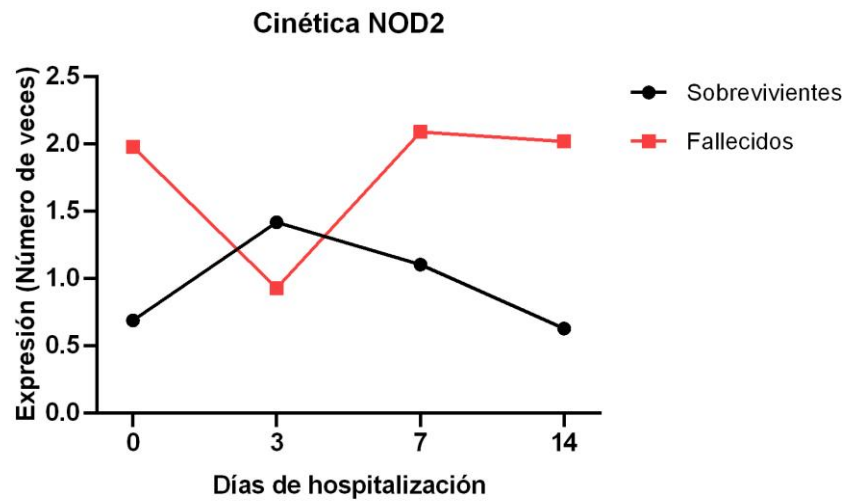
6.4 Cinéticas de la expresión de genes de respuesta antiviral diferencialmente expresados en PBMC de pacientes hospitalizados sobrevivientes y fallecidos con COVID-19

Por otro lado, se analizó también la cinética de los trece genes que resultaron diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19. La normalización de la expresión de los genes de cada grupo de pacientes se obtuvo con base en la expresión de un grupo control de un rango de edad ± 11 años, para así conseguir el $2^{-\Delta\Delta C_t}$, con lo que se obtuvieron los genes diferencialmente expresados, ya sea sobreexpresados o subexpresados entre pacientes con COVID-19 sobrevivientes y fallecidos a lo largo del día 0, 3 y 7 de hospitalización. Con lo anterior se comparó la expresión génica dentro de cada grupo al día 0, 3 y 7 de hospitalización. No se realizó comparación con el día 14 de hospitalización debido al bajo número de muestras obtenidas que no permite realizar un análisis estadístico confiable, sin embargo, se representa en las gráficas el valor obtenido como mediana para cada grupo de pacientes.









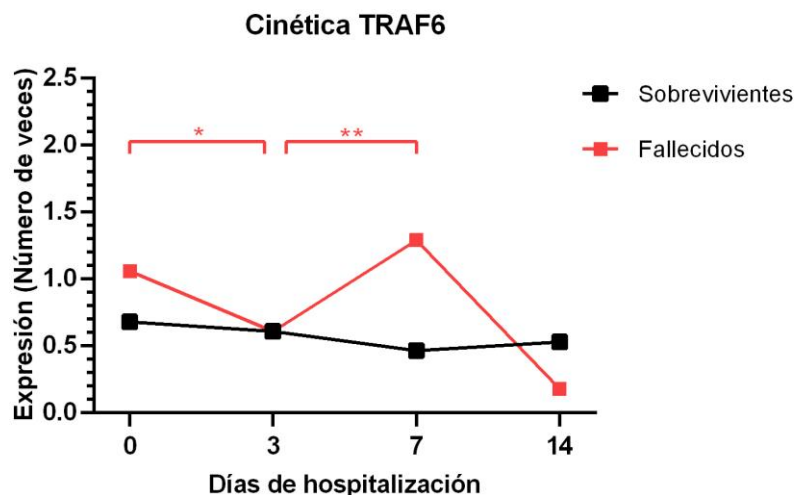
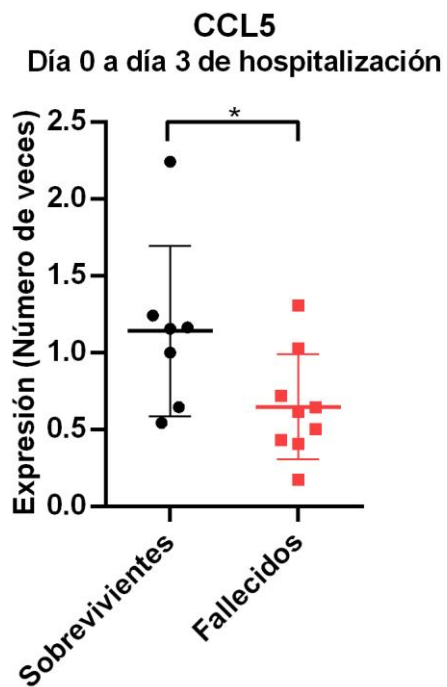
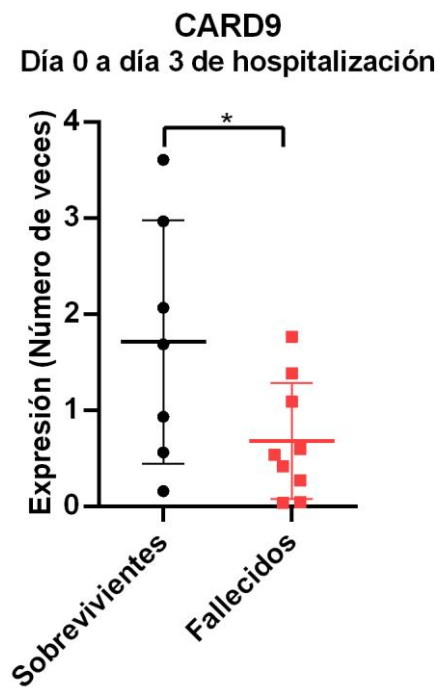
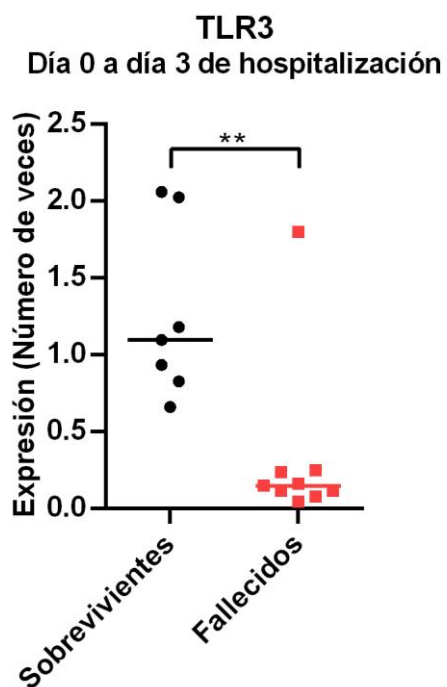
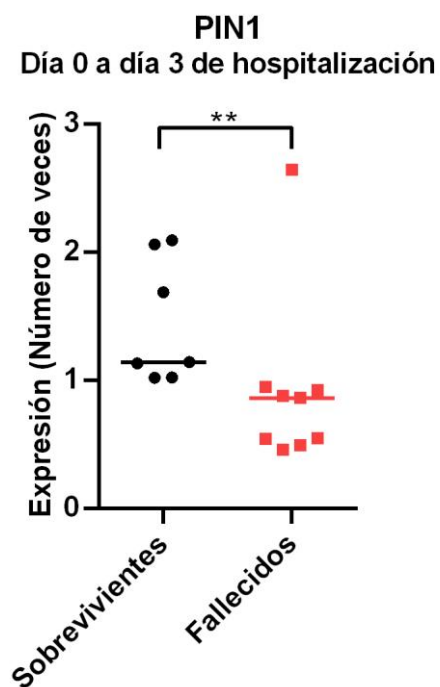


Figura 8. Cinéticas de expresión de los genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 a lo largo de los cuatro tiempos de hospitalización evaluados. Los valores obtenidos de la normalización de la expresión génica se compararon dentro de cada grupo de pacientes con COVID-19 en cada uno de los tiempos evaluados. Se muestra la mediana de cada grupo para cada uno de los días de hospitalización evaluados. Se realizó Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, N de sobrevivientes al día 0 de hospitalización=11, al día 3 de hospitalización=7, al día 7 de hospitalización=8 y al día 14 de hospitalización=3. N de fallecidos al día 0 de hospitalización=9, al día 3 de hospitalización= 9, al día 7 de hospitalización= 7 y al día 14 de hospitalización 1.

6.4 Evaluación de la expresión diferencial de genes de respuesta antiviral en PBMC de pacientes hospitalizados sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 en etapas tempranas de la hospitalización

Debido a que era de nuestro interés identificar genes diferencialmente expresados en etapas tempranas de la hospitalización de los pacientes con COVID-19, se llevó a cabo un análisis de normalización de la expresión tomando en cuenta el día de ingreso de cada paciente como el control para normalizar la expresión del día 3 de hospitalización para cada paciente con COVID-19, de esta forma se obtuvo el $2^{-\Delta\Delta C_t}$, con lo que se obtuvieron los genes diferencialmente expresados, ya sea sobreexpresados o subexpresados entre pacientes con COVID-19 sobrevivientes y fallecidos al día 3 de hospitalización. Posteriormente se realizó un análisis estadístico, donde se encontraron siete genes diferencialmente expresados al día

3 de hospitalización entre el grupo de pacientes hospitalizados sobrevivientes en comparación con los pacientes fallecidos con respecto al día de ingreso hospitalario.



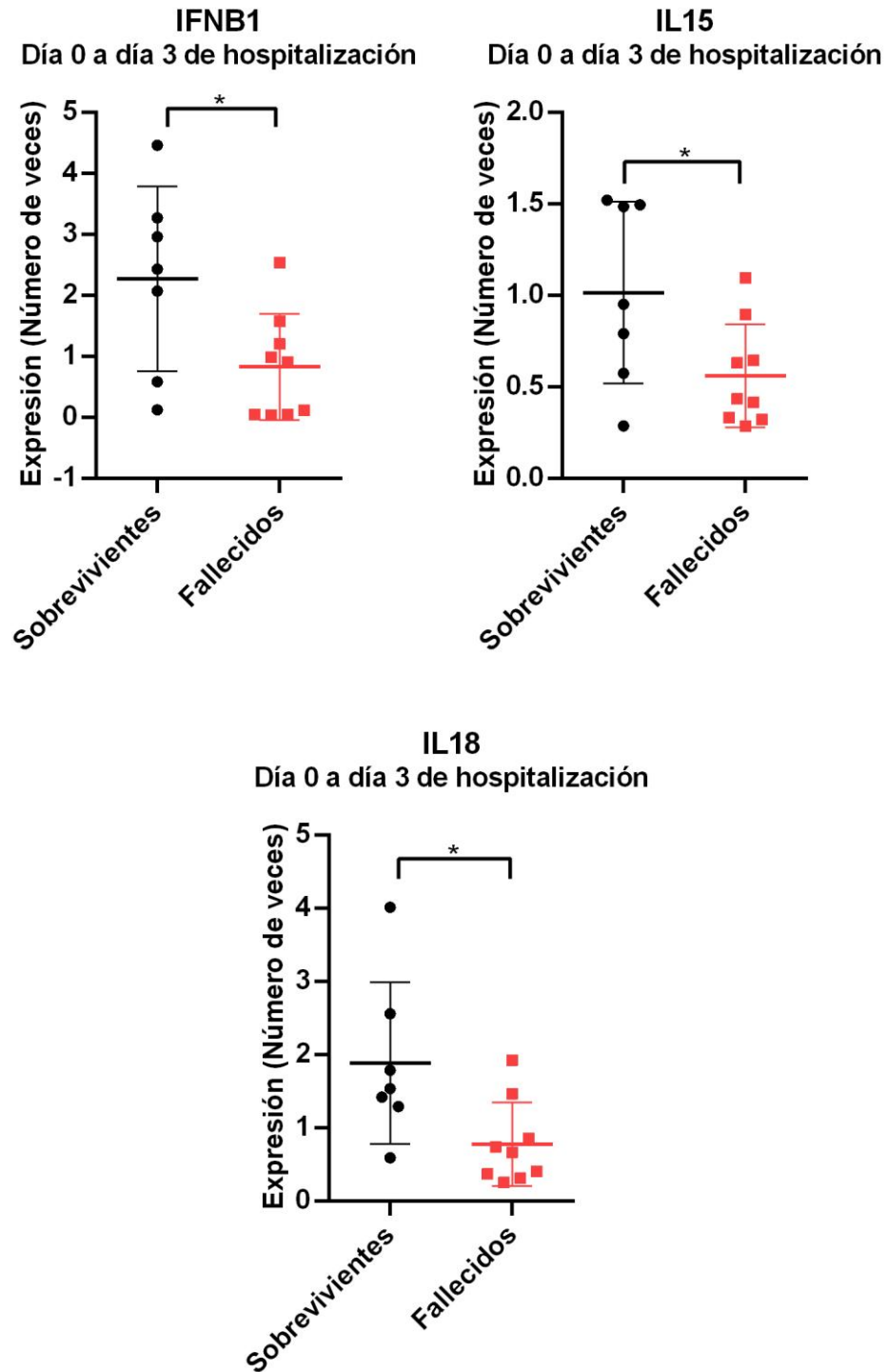


Figura 9. Genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 al día 3 de hospitalización, cuando se normaliza la expresión con respecto al día de ingreso hospitalario. Se normalizó la expresión génica del grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos al día 3 de hospitalización contra el día de ingreso hospitalario. Se muestran los genes que resultaron diferencialmente expresados entre el grupo

de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19. Se muestra media y desviación estándar cuando los datos tuvieron distribución normal y se pudo realizar Prueba t de Student. Se muestra sólo la mediana cuando los datos tuvieron distribución no paramétrica y se realizó Prueba de U de Mann-Whitney, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, N de sobrevivientes=7, N de fallecidos=9.

6.4 Evaluación de las concentraciones de citocinas en suero involucradas en el proceso inflamatorio de pacientes hospitalizados sobrevivientes y fallecidos con COVID-19

Se analizaron las concentraciones encontradas de las diez citocinas evaluadas en el suero de los pacientes hospitalizados con COVID-19 al día 0,3 y 7 de hospitalización, realizando una comparación entre pacientes sobrevivientes y fallecidos. Una vez más, no fue posible llevar a cabo análisis con los datos obtenidos al día 14 de hospitalización debido al bajo número de muestras obtenidas. Se encontró que de las diez citocinas evaluadas: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN- α 2, IFN- γ y TNF- α ; solamente una citocina muestra diferencia en la concentración detectada entre el grupo de sobrevivientes y fallecidos, IL-10 en el día 7 de hospitalización. A continuación, se muestra la gráfica que representa esta diferencia en la concentración encontrada en suero, así como la cinética de la concentración de esta citocina en los dos grupos de pacientes con COVID-19 a lo largo de los cuatro tiempos de hospitalización.

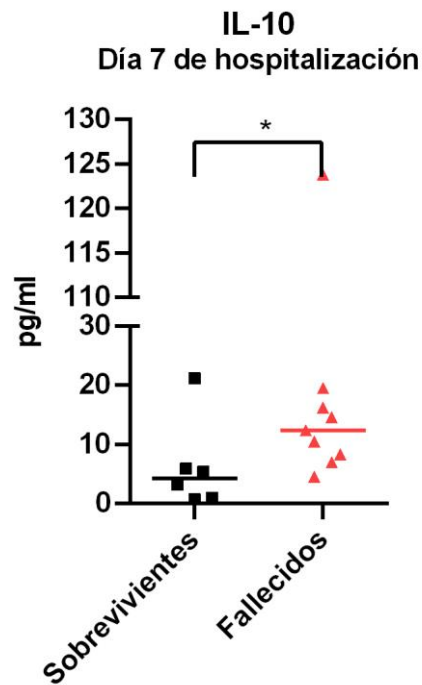


Figura 10. Concentración de citocina IL-10 entre el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 al día 7 de hospitalización. Se midió la concentración en suero de IL-10 en los grupos de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 al día 7 de hospitalización. Se muestra la mediana de cada grupo, se realizó Prueba de U de Mann-Whitney, $*p \leq 0.05$, N de sobrevivientes=6, N de fallecidos=9.

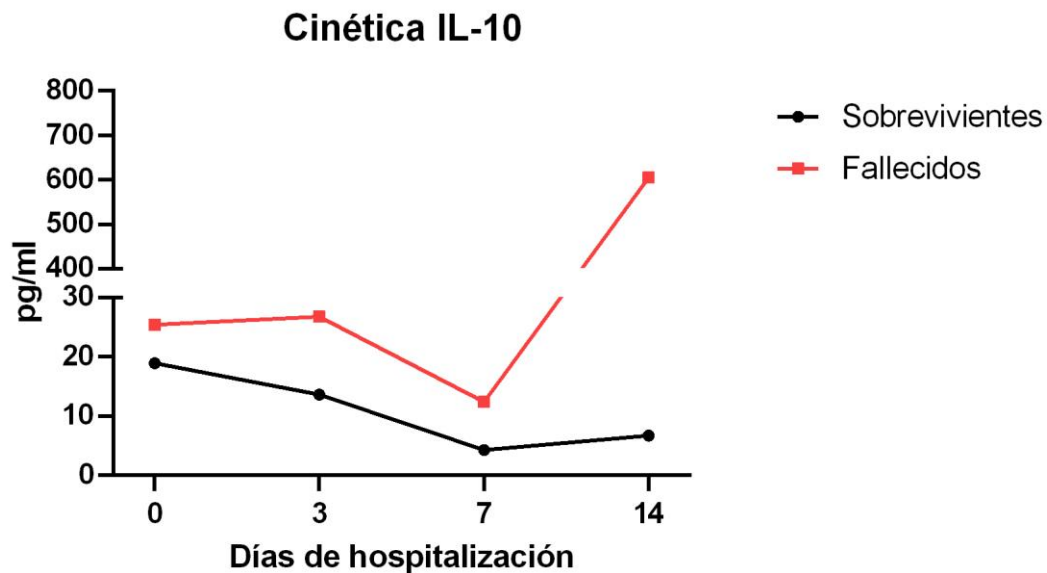
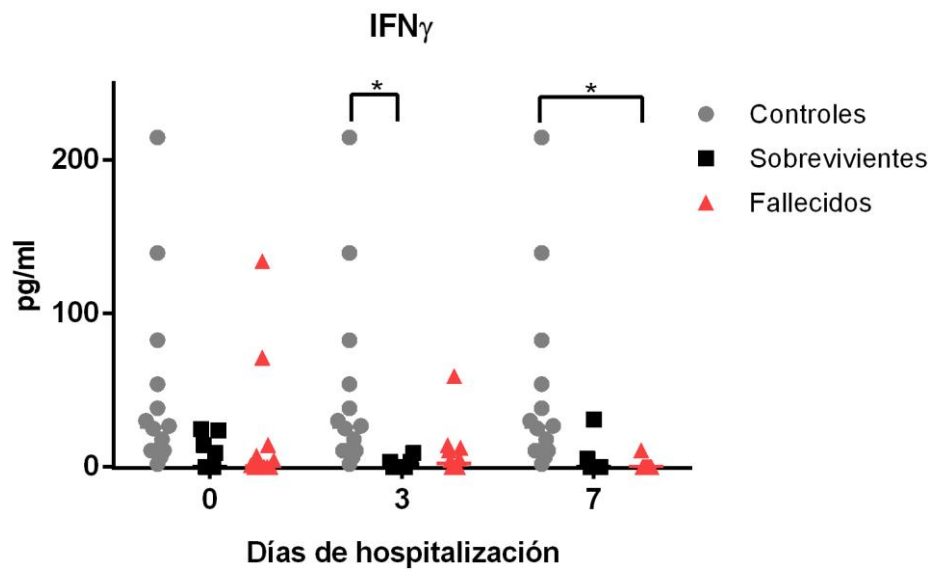
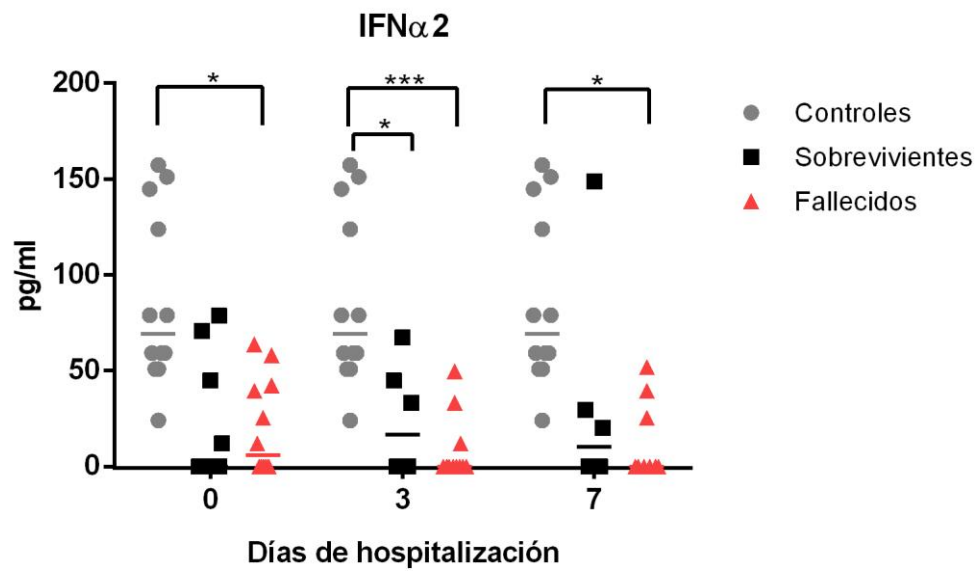
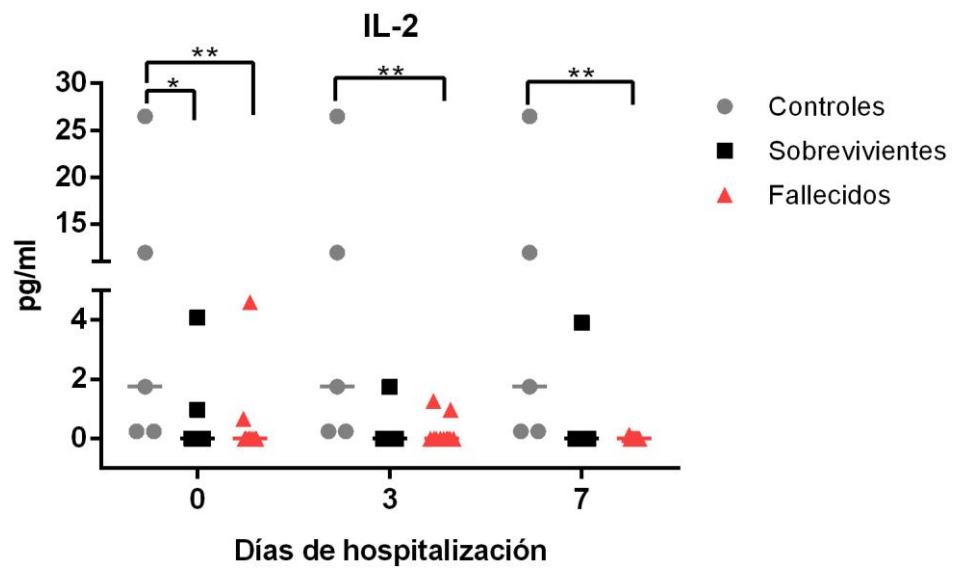
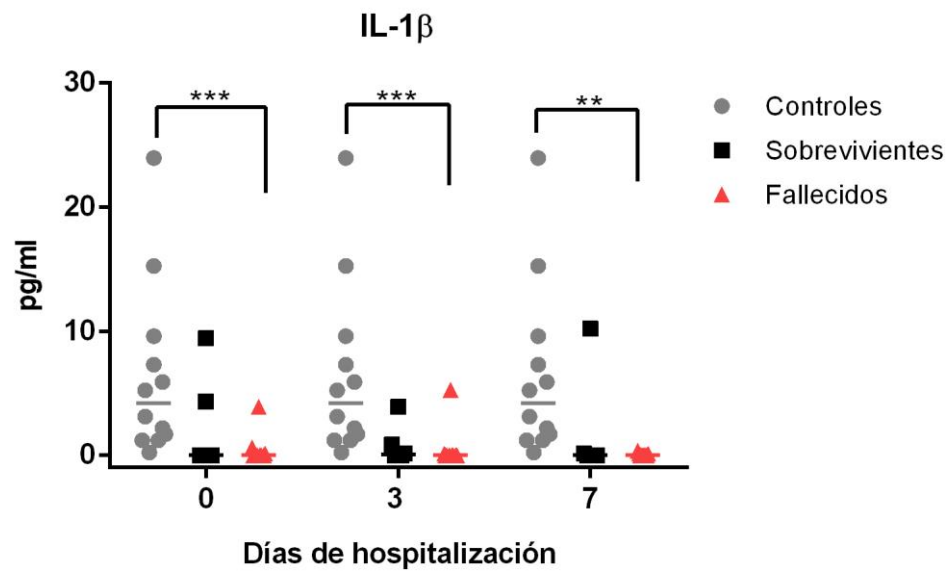


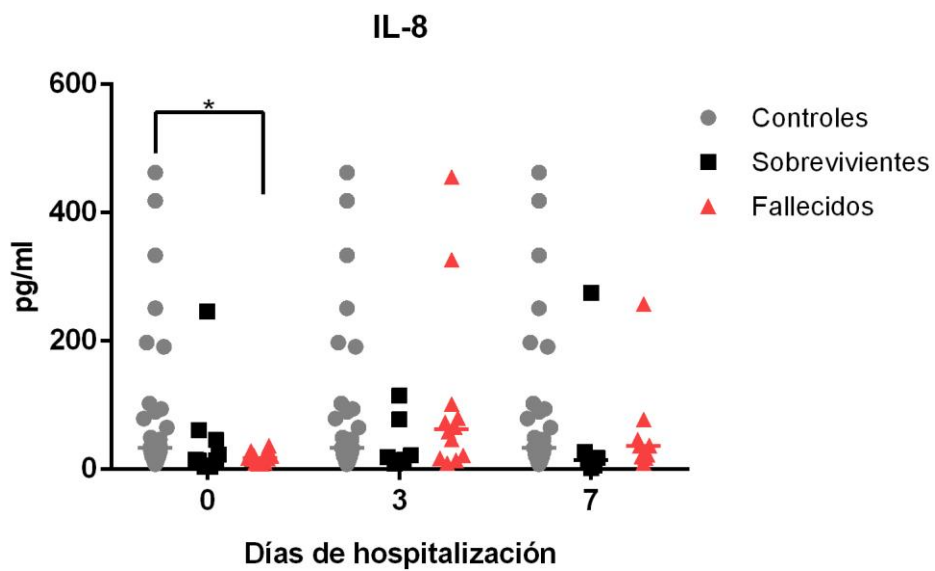
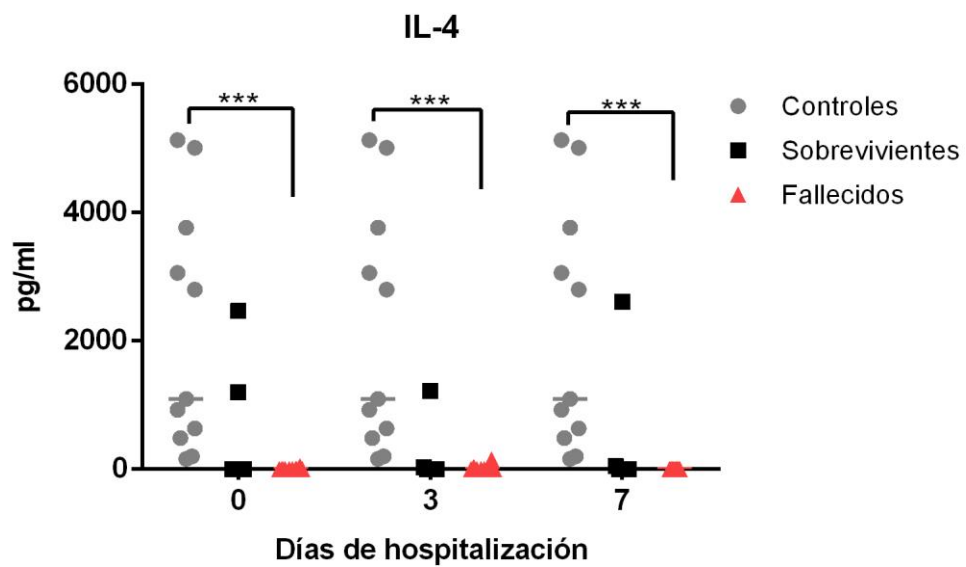
Figura 11. Cinética de la concentración de la citocina IL-10 encontrada en el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 a lo largo de los cuatro tiempos de hospitalización evaluados. Se muestra la mediana de la concentración detectada de IL-10 en cada grupo para cada uno de los días de hospitalización evaluados. Se realizó Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, N de sobrevivientes al día 0 de hospitalización=9, al día 3 de hospitalización=6, al día 7 de hospitalización=6 y al día 14 de hospitalización=2. N de fallecidos al día 0 de hospitalización=12, al día 3 de hospitalización= 12, al día 7 de hospitalización= 9 y al día 14 de hospitalización 1.

6.4 Evaluación de las concentraciones de citocinas en suero involucradas en el proceso inflamatorio de pacientes hospitalizados con COVID-19 en comparación con controles sanos

Se analizaron las concentraciones obtenidas de las diez citocinas evaluadas: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN- α 2, IFN- γ y TNF- α ; entre el grupo de controles sanos a un único tiempo, así como en los pacientes hospitalizados con COVID-19 sobrevivientes y fallecidos a los días 0, 3 y 7 de hospitalización. A continuación, se muestran las citocinas que mostraron al menos una diferencia significativa entre alguno de los grupos para al menos un tiempo evaluado.







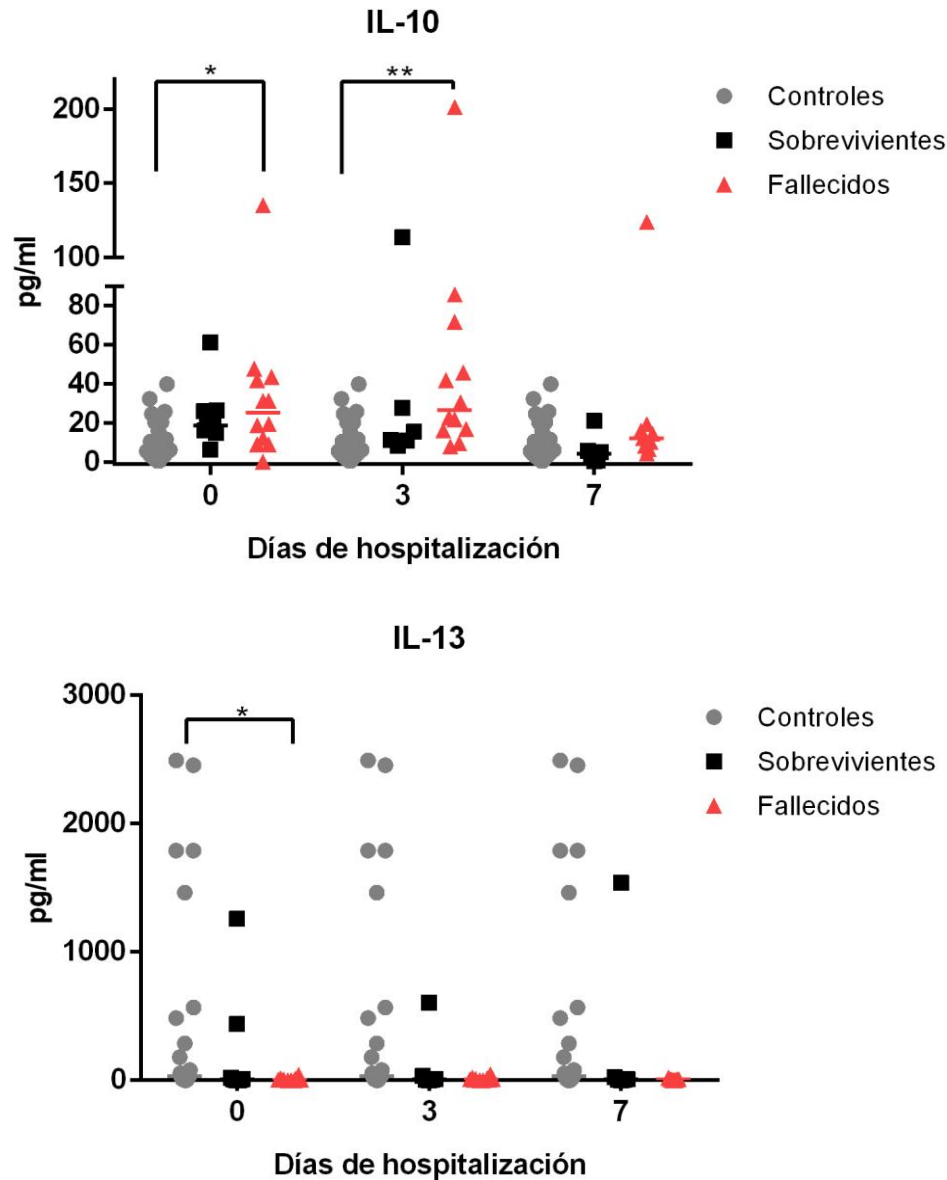


Figura 12. Concentración de las citocinas que mostraron una diferencia entre grupos de pacientes hospitalizados con COVID-19 y controles sanos al día 0, 3 y 7 de hospitalización. Se midió la concentración en suero de diez citocinas involucradas en el proceso inflamatorio: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN- α 2, IFN- γ y TNF- α , de éstas citocinas sólo ocho mostraron diferencias significativas entre alguno de los tres grupos evaluados, a alguno de los tres tiempos evaluados. Se muestran aquellas citocinas que mostraron al menos una diferencia significativa entre dos grupos, se observa con una línea la mediana de cada grupo y la diferencia significativa obtenida mediante la Prueba de Kruskal-Wallis, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. En todas las citocinas evaluadas la N de sobrevivientes al día 0 de hospitalización = 9, al día 3 de hospitalización = 6 y al día 7 de hospitalización = 6, mientras que la N de fallecidos al día 0 de hospitalización = 12, al día 3 de hospitalización = 12 y al día 7 de hospitalización = 9. N de controles = 11 (IFN- α 2), 14 (IFN- γ), 12 (IL-1 β), 5 (IL-2), 11 (IL-4), 27 (IL-8), 20 (IL-10), 22 (IL-13).

6.5 Análisis de datos demográficos y clínicos de pacientes hospitalizados sobrevivientes y fallecidos con COVID-19

Una vez realizados los análisis correspondientes a la expresión de genes de respuesta antiviral y la evaluación de citocinas en suero involucradas en el proceso inflamatorio de COVID-19, se procedió a realizar un análisis involucrando los hallazgos encontrados en este estudio y las variables clínicas recopiladas durante la estancia hospitalaria de los pacientes de esta cohorte. Se realizaron análisis estadísticos dependiendo de si las variables eran de tipo discretas o continuas, por lo que a continuación, se muestran algunas de las variables representativas evaluadas y los casos en los que se encontró una diferencia significativa o dependencia entre las variables, según sea el caso.

Tabla 8. Análisis de datos demográficos y clínicos de los pacientes hospitalizados sobrevivientes y fallecidos con COVID-19

	N=24	Sobrevivientes (N=11)	Fallecidos (N=13)	Valor de p
Sexo				
Mujeres	10 (41.7%)	6 (54.5%)	4 (30.8%)	0.043 ^{a*}
Hombres	14 (58.3%)	5 (45.5%)	9 (69.2%)	
Edad				
21 a 31	4 (16.7%)	3 (27.3%)	1 (7.7%)	0.166 ^a
32 a 41	0	0	0	
42 a 51	5 (20.8%)	3 (27.3%)	2 (15.4%)	
52 a 61	5 (20.8%)	3 (27.3%)	2 (15.4%)	
62 a 71	5 (20.8%)	2 (18.2%)	3 (23%)	
72 a 81	5 (20.8%)	0	5 (38.5%)	
Días de inicio de síntomas				
0-4	3 (12.5%)	1 (9.1%)	2 (15.4%)	0.824 ^a
5-8	15 (62.5%)	7 (63.6%)	8 (61.5%)	
9-12	3 (12.5%)	2 (18.2%)	1 (7.7%)	
13-16	3 (12.5%)	1 (9.1%)	2 (15.4%)	
Comorbilidades				
Obesidad	8 (33.3%)	2 (18.2%)	6 (46.1%)	0.148 ^a
Diabetes	11 (45.8%)	5 (45.5%)	6 (46.1%)	0.973 ^a
Hipertensión	12 (50%)	4 (36.4%)	8 (61.5%)	0.219 ^a
ERC	3 (12.5%)	0	3 (23%)	0.089 ^a

Inmunosupresión	1 (4.2%)	0	1 (7.7%)	0.347 ^a
Cáncer	1 (4.2%)	0	1 (7.7%)	0.347 ^a
Cardiopatía	2 (8.3%)	0	2 (15.4%)	0.174 ^a

Variables al ingreso hospitalario

Linfocitos	24	0.88 10 ³ /μl	1.07 10 ³ /μl	0.543
Leucocitos	24	7.4 10 ³ /μl	7.3 10 ³ /μl	0.487
Plaquetas	24	256 10 ³ /μl	176 10 ³ /μl	0.068
Creatinina	24	0.9 mg/dl	1.6 mg/dl	0.036 *
AST	24	56 U/l	55 U/l	0.908
ALT	24	45 U/l	23 U/l	0.098
Troponina	22	5 ng/ml	13.7 ng/ml	0.085
IgG SARS-CoV-2	9 positivos (37.5%)	7 positivos (63.6%)	2 positivos (15.38%)	0.030 ^{a*}
PSI				
2	11 (45.8%)	9 (81.8%)	2 (15.38%)	0.012 ^{a*}
3	3 (12.5%)	0	3 (23%)	
4	6 (25%)	1 (9.1%)	5 (38.5%)	
5	4 (16.7%)	1 (9.1%)	3 (23%)	

Tratamiento

Esteroides	7 (29.2%)	5 (45.5%)	2 (15.38%)	0.074 ^a
Plasmaféresis	16 (66.7%)	8 (72.7%)	8 (61.5%)	0.562 ^a
O ₂ Alto flujo	12 (50%)	4 (36.4%)	8 (61.5%)	0.211 ^a
VMI	14 (58.3%)	5 (45.5%)	9 (69.2%)	0.239 ^a
UCI	17 (70.8%)	7 (63.6%)	10 (76.9%)	0.476 ^a
Hemodiálisis	9 (37.5%)	1 (9.1%)	8 (61.5%)	0.018 ^{a*}
Sobreinfección	4 (16.7%)	2 (18.2%)	2 (15.38%)	0.840 ^a

Citocina diferencialmente expresada

IL-10 t7	15	4.28 pg/ml	12.42 pg/ml	0.045 *
----------	----	------------	-------------	---------

	N=20	Sobrevivientes (N=11)	Fallecidos (N=9)	Valor de p
--	------	-----------------------	------------------	------------

Genes diferencialmente expresados

MX1 t0				
0	6 (30%)	4 (36.4%)	2 (22.2%)	0.459 ^a
1	1 (5%)	1 (9.1%)	0	
2	13 (65%)	6 (54.5%)	7 (77.8%)	

OAS2 t0				
0	9 (45%)	7 (63.6%)	2 (22.2%)	0.073 ^a
1	1 (5%)	1 (9.1%)	0	
2	10 (50%)	3 (27.3%)	7 (77.8%)	
CD86 t7				
0	13 (65%)	10 (90.9%)	3 (33.3%)	0.007 ^{a*}
1	7 (35%)	1 (9.1%)	6 (66.7%)	
2	0	0	0	
CXCL9 t7				
0	8 (40%)	6 (54.5%)	2 (22.2%)	0.205 ^a
1	3 (15%)	2 (18.2%)	1 (11.1%)	
2	9 (45%)	3 (27.3%)	6 (66.7%)	
DHX58 t7				
0	9 (45%)	5 (45.5%)	4 (44.4%)	0.179 ^a
1	3 (15%)	3 (27.3%)	0	
2	8 (40%)	3 (27.3%)	5 (55.6%)	
FADD t7				
0	13 (65%)	6 (54.5%)	7 (77.8%)	0.167 ^a
1	6 (30%)	5 (45.5%)	1 (11.1%)	
2	1 (5%)	0	1 (11.1%)	
IFNA1 t7				
0	5 (25%)	3 (27.3%)	2 (22.2%)	0.795 ^a
1	0	0	0	
2	15 (75%)	8 (72.7%)	7 (77.8%)	
IFNA2 t7				
0	5 (25%)	3 (27.3%)	2 (22.2%)	0.795 ^a
1	0	0	0	
2	15 (75%)	8 (72.7%)	7 (77.8%)	
IL12B t7				
0	5 (25%)	3 (27.3%)	2 (22.2%)	0.795 ^a
1	0	0	0	
2	15 (75%)	8 (72.7%)	7 (77.8%)	
NOD2 t7				
0	14 (70%)	9 (81.8%)	5 (55.6%)	0.030 ^{a*}
1	2 (10%)	2 (18.2%)	0	
2	4 (20%)	0	4 (44.4%)	
PYDC1 t7				
0	8 (40%)	5 (45.5%)	3 (33.3%)	0.256 ^a
1	2 (10%)	2 (18.2%)	0	
2	10 (50%)	4 (36.4%)	6 (66.7%)	
RIPK1 t7				

0	15 (75%)	8 (72.7%)	7 (77.8%)	0.390 ^a
1	4 (20%)	3 (27.3%)	1 (11.1%)	
2	1 (5%)	0	1 (11.1%)	
TRAF6 t7				
0	11 (55%)	6 (54.5%)	5 (55.6%)	0.060 ^a
1	6 (30%)	5 (45.5%)	1 (11.1%)	
2	3 (15%)	0	3 (33.3%)	

Los datos corresponden al número de casos correspondientes o medianas de cada variable cuantitativa. Los valores de 0, 1 a 2 en cada gen corresponden a sin cambios, subexpresado y sobreexpresado respectivamente. 0>0.5 y <2 número de veces de expresión génica, 1<0.5 número de veces de expresión génica y 2>2 número de veces de expresión génica. Los valores de p se obtuvieron mediante Prueba de U de Mann Whitney. ^a Los valores de p se obtuvieron mediante chi cuadrada, * p≤0.05.

7. DISCUSIÓN

La enfermedad causada por SARS-CoV-2, COVID-19, es una enfermedad que en la mayoría de los casos se resuelve de manera exitosa, sin embargo, en el 20 % de los pacientes se desarrollan casos severos de esta enfermedad (2,110). Es en estos casos donde pueden ocurrir complicaciones fatales como: el síndrome de dificultad respiratoria aguda, el síndrome de disfunción multiorgánica, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, el daño hepático agudo y la hipoxemia (2,147). El lograr identificar a los pacientes que ingresan al hospital y que tienen probabilidad de desarrollar casos severos de COVID-19, permitiría al personal médico el tomar decisiones oportunas respecto a qué pacientes deben ser hospitalizados y monitoreados de manera estrecha y qué pacientes pueden incluso ser dados de alta con acompañamiento desde casa.

En México se han llevado a cabo algunos estudios para determinar los factores de riesgo que pueden predecir la severidad de COVID-19 en pacientes hospitalizados, en este sentido, en un estudio realizado en un hospital de México con 800 pacientes ingresados por COVID-19, se encontró que el 45% de los pacientes que fallecieron requerían admisión a unidad de cuidados intensivos pero no lo recibieron debido a la falta de disponibilidad de camas (148). En esta cohorte estudiada se reportó que la principal causa de muerte en pacientes que no tuvieron disponibilidad a una cama en unidad de cuidados intensivos fue el síndrome de dificultad respiratoria aguda, mientras que en los pacientes que fallecieron y sí tuvieron acceso a la atención médica completa, las principales causas de muerte fueron: el choque séptico, seguido del síndrome de la dificultad respiratoria aguda. Los principales factores de riesgo asociados a la muerte por COVID-19 en pacientes mexicanos han sido: el sexo masculino, la presencia de alguna comorbilidad, específicamente la obesidad y una saturación de oxígeno <80% al momento de la admisión hospitalaria (148–151).

Debido a la importancia de actuar a tiempo y de no saturar las instalaciones hospitalarias para tenerlas disponibles para los pacientes que así lo requieran, es necesaria la búsqueda de biomarcadores de pronóstico que sean rápidos y de fácil obtención al ingreso hospitalario, esto permitirá el manejo adecuado del tratamiento que deben recibir los pacientes con COVID-19 severo (152). En este sentido, nuestro trabajo se enfocó en la búsqueda de biomarcadores de expresión génica asociada a la respuesta inmune innata antiviral. Cabe

señalar que en nuestra cohorte de pacientes la mayoría (63.6%) ingresaron al hospital al día 5 a 8 de inicio de los síntomas, el 27.2% al día 0 a 12 de inicio de los síntomas y la minoría (9.1%) al día 13 a 16 desde el inicio de los síntomas. Nosotros encontramos un grupo de genes que muestran un aumento en la expresión de las PBMC provenientes de pacientes hospitalizados con COVID-19 en comparación con controles sanos, estos fueron: CASP8, CCL5, CHUK, CXCL11, FOS, IFNA1, IFNA2, IFNB1, IL12B, MAP2K1, MAP2K3, MAPK14, MAPK3 PYDC1, RELA, SPP1 y TRAF3. Mientras que se encontró disminuida la expresión de los siguientes genes: CD86, CTSS, IRF5, MEFV, TLR8 y TRADD. Estos genes se ven regulados en las PBMC de los pacientes con COVID-19 de la cohorte evaluada a lo largo de la hospitalización, por lo que podría representar una firma génica de la infección por SARS-CoV-2. Estudios previos en poblaciones distintas a la mexicana han reportado en general el involucramiento de genes asociados a una hiperactivación de células mieloides, activación de la vía de inflamación NF- κ B y de IFN Tipo I, lo cual concuerda con la firma génica de nuestra cohorte de pacientes hospitalizados con COVID-19 (153–155).

No obstante, para la búsqueda de biomarcadores que permitan el pronóstico de pacientes que presentarán un cuadro severo de COVID-19, identificamos aquellos genes que presentaban expresión diferencial entre el grupo de pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19. En esta comparación encontramos un aumento diferencial en la expresión de los genes MX1 y OAS2 al día del ingreso hospitalario en los pacientes que fallecieron, en comparación con los que sobrevivieron a la hospitalización por COVID-19. Cabe destacar que estos dos genes son genes estimulados por interferón, es decir, forman parte de la respuesta de la activación de la vía de señalización por IFN Tipo I (156,157).

MX1 es un efector antiviral inducido por la vía de interferón, es una proteína de tipo GTPasa que se encuentra en el citoplasma y participa ante la infección de otros virus de RNA como influenza A (157,158). Su función antiviral se debe a que es capaz de inhibir la transcripción y la traducción de proteínas virales, aunque se desconocen los mecanismos específicos mediante los cuales lleva a cabo estas funciones (159,160). Los resultados encontrados en este trabajo están de acuerdo con lo reportado previamente por Bizzotto *et al.*, en donde ellos encontraron que los niveles de expresión de los genes MX1 y MX2 se encontraban incrementados en pacientes con COVID-19, además encontraron que esta expresión se

correlacionaba de forma positiva con la carga viral y de forma negativa con la edad de los pacientes. Sin embargo, una limitante del estudio de Bizzotto *et al.*, es que no se tomó en consideración la severidad de la enfermedad que presentaban los pacientes con COVID-19 sino que fue sólo un estudio de casos y controles, sujetos con COVID-19 en comparación con controles sanos (161). Por otro lado, OAS2 es una proteína que tiene la función de detectar RNA de doble cadena y posteriormente, sintetizar oligoadenilatos que inducen la dimerización y activación de la ribonucleasa L para la degradación del genoma viral (162,163). Nuestros resultados muestran concordancia con estudios que reportan un incremento de este gen en células Calu-3, A549-ACE2 y Huh7 infectadas con el virus SARS-CoV-2 (164,165). Por lo que, estos resultados demuestran que al ingreso hospitalario de los pacientes fallecidos existe una señalización de IFN I que está produciendo los llamados genes de respuesta ante esta vía de señalización y que estos se encuentran incrementados en los pacientes que fallecieron en comparación con los que sobrevivieron a COVID-19. Por lo que nuestro estudio reporta que la expresión incrementada de MX1 podría ser utilizado como factor pronóstico de COVID-19, como ya ha sido reportado previamente, sin embargo, OAS2 no ha sido previamente propuesto como un factor de pronóstico adverso en COVID-19.

En nuestra cohorte de estudio no se encontró una diferencia significativa en la expresión de genes de respuesta antiviral al día 3 de hospitalización, sin embargo, se encontraron 11 genes diferencialmente expresados al día 7 de hospitalización. De acuerdo a estudios reportados, se ha asociado que en la segunda semana de la enfermedad es cuando ocurre la tormenta de citocinas que podría provocar las complicaciones como coagulopatías y un estado de hiperinflamación (69,166). La mayoría de los pacientes de la cohorte (63.6%) ingresaron al hospital al día 5 a 8 de inicio de los síntomas, por lo que se podría sugerir que la mayoría de los pacientes de la cohorte se encontraban alrededor de la segunda semana de síntomas al día 7 de hospitalización. En este tiempo evaluado se encontraron diferencialmente expresados los siguientes genes: RIPK1, NOD2, CXCL9, DHX58, PYDC1, FADD, IFNA1, IFNA2, IL12B y TRAF6 que se mostraron incrementados en los pacientes fallecidos en comparación con los pacientes que sobrevivieron a COVID-19, mientras que CD86 se mostró disminuido en los pacientes fallecidos en comparación con los pacientes sobrevivientes.

De los genes diferencialmente expresados, dos de ellos son genes de respuesta ante la activación de la vía de IFN-I: IFNA1 e IFNA2 (83,167). Algunos de estos genes codifican para proteínas encargadas de detectar RNA de cadena sencilla como NOD2 o DHX58 que es capaz de detectar tanto RNA de cadena tanto doble como sencilla (168,169). Mientras que otros genes codifican para proteínas que son clave en vías de señalización que promueven la inflamación, como lo es PYDC1 que participa en la vía de NF- κ B y RIPK1, FADD y TRAF6 que participa en la vía de TNF (170–173). Otros genes codifican para proteínas que tienen función de citocinas quimioatrayentes como CXCL9 que regula el tráfico de linfocitos T e IL12B que participa como factor de crecimiento para linfocitos T y NK activados (174,175). Por otro lado, los pacientes que fallecieron presentan un decremento de CD86 que es un gen que codifica para una proteína coestimuladora de membrana que se expresa en células presentadoras de antígeno, lo que se podría asociar a una pérdida de esta función en las células mononucleares de pacientes fallecidos (176). La sobreexpresión de NOD2, ya ha sido reportada asociada a otra infección respiratoria, en este caso causada por el virus sincitial respiratorio (SRV por sus siglas en inglés), en esta infección la sobreexpresión de NOD2 junto con la expresión de TLR3 y RIG-I, se ha asociado a una sobreexpresión de citocinas proinflamatorias (177). Previamente se ha reportado que los neutrófilos infiltrados en pacientes que fallecieron por COVID-19 severo presentan una alta expresión de la proteína RIPK1, lo que sugiere la participación de esta proteína en las vías de necroptosis de neutrófilos, como ya ha sido reportado en la infección respiratoria causada por el SRV (178,179). También se ha encontrado que los niveles altos de la citocina CXCL9 en suero, se han asociado como biomarcador de severidad en COVID-19 (180). Los resultados obtenidos en nuestro estudio están en concordancia con un estudio que reportó niveles de expresión incrementados de los genes IFNA1, IFNA2, IL12B, TRAF6 y CXCL9 en células de sangre periférica de pacientes con COVID-19 leves, moderados, severos y críticos. Sin embargo, en este mismo estudio se reportó una subexpresión de FADD en pacientes con COVID-19, mientras que en nuestro estudio no se encontró esta tendencia sino la opuesta, lo cual puede deberse a que en nuestro estudio la categorización de los pacientes no fue por severidad sino por sobrevivencia a la enfermedad (181,182). Por lo que, en general, los pacientes que fallecieron por COVID-19 presentaron al día 7 de hospitalización, niveles incrementados de genes que participan en la respuesta inmune innata antiviral, en la que

participan linfocitos T, NK y la vía de señalización NF κ B y TNF, así como un decremento en la expresión de CD86, proteína involucrada en la presentación de antígenos.

La búsqueda de biomarcadores de pronóstico requiere de biomoléculas que se puedan encontrar de forma sencilla y sin prácticas invasivas en pacientes que ingresan al hospital o en etapas tempranas de su hospitalización, por lo que se realizó un análisis tomando en cuenta los cambios en la expresión de los genes evaluados al día 3 de hospitalización en relación al día de ingreso hospitalario en cada paciente. Se identificaron siete genes disminuidos en los pacientes que fallecieron de COVID-19, estos son: CARD9, CCL5, IFNB1, IL15, IL18, PIN1 y TLR3. Cabe señalar que nuevamente se tiene un gen estimulado por interferón alterado, como lo es IFNB1 el cual codifica para una citocina que señala a través del receptor para IFN Tipo I (160). Por otro lado, se encontraron también disminuidos los genes que codifican para las citocinas: CCL5 que tiene como función la quimio atracción de monocitos, IL-15 que estimula la proliferación de linfocitos T e IL-18 que permite la secreción de IFN- γ y la activación de linfocitos NK (95,183,184). Mientras que PIN1 codifica para una proteína que induce cambios conformacionales en proteínas de la vía de señalización JNK, CARD9 es una proteína adaptadora en la señalización mediante TLR y TLR3 es un receptor que detecta RNA de doble cadena dentro de la célula (185–188). Nuestros resultados respecto al gen IFNB1 no están en concordancia con lo reportado previamente en un estudio que encontró que la expresión positiva de transcritos del gen IFNB1 en mucosa nasal podía utilizarse como factor predictor de la duración de la estancia en unidad de cuidados intensivos (189). En nuestro caso se observó un decremento en la expresión de este gen en los pacientes que presentaron peor pronóstico, sin embargo, es importante señalar que la muestra utilizada en nuestro estudio fueron PBMC y esa variable puede ser la responsable de la diferencia en la tendencia de expresión génica observada. También se ha reportado la expresión incrementada del gen IL15 en células de sangre periférica de pacientes con COVID-19 leve, moderado, severo y crítico, no obstante, como se mencionó anteriormente en este estudio la categorización de los pacientes fue distinta y a esto podrían atribuirse las diferencias observadas (181). Por último, otros estudios han reportado que los niveles elevados de las citocinas IL-18 y CCL5 en suero se han asociado a mayor severidad en pacientes con COVID-19, en este caso la expresión elevada de estas proteínas podría deberse a que otras células son las responsables de su secreción y no las PBMC recuperadas en nuestro estudio,

sin embargo hacen falta experimentos para poder corroborar esta hipótesis (190,191). Por lo que, se demostró que distintos genes que codifican para proteínas involucradas en una respuesta inmune exitosa se encuentran disminuidos en los pacientes que fallecieron por COVID-19, esto en relación al nivel de expresión que presentaban al día de ingreso hospitalario y posteriormente al tercer día de su estancia en el hospital.

Otro de los biomarcadores por excelencia para la detección de factores de pronóstico para algunas enfermedades es la identificación y cuantificación de citocinas en el suero o en el plasma de pacientes (192). En el caso de COVID-19 se han reportado ya algunas citocinas en suero que pueden servir para predicción de severidad en los pacientes (193). En un estudio en pacientes hospitalizados con COVID-19 en México, se encontró que los niveles de IL-6 podían predecir la no sobrevivencia de los pacientes (194). En nuestro estudio no encontramos esta asociación con IL-6, de hecho, no se encontraron diferencias significativas en esta citocina con ninguno de los tres grupos a lo largo del tiempo evaluado. Esto podría deberse al bajo número de muestras obtenidas que no permitió corroborar esa diferencia específica, sería necesario llevar a cabo un estudio con un mayor número de muestras para observar si se corrobora esa tendencia reportada previamente para IL-6. Sin embargo, se encontró una diferencia significativa en la concentración de IL-10 al día 7 de hospitalización, los pacientes que fallecieron por COVID-19 reportaron niveles más elevados de esta citocina en comparación con los sobrevivientes, lo cual corresponde con lo que ha sido reportado por distintos estudios realizados en otras poblaciones donde se propone a IL-10 como un biomarcador de pronóstico de severidad en pacientes con COVID-19 (2,155,195,196). Se ha sugerido que después de la infección por SARS-CoV-2 ocurre una inducción temprana de IL-10, que promueve sus efectos anti inflamatorios en un ambiente sumamente pro inflamatorio, no obstante, estos niveles tan altos podrían amplificar la sepsis que frecuentemente se ve en los pacientes con COVID-19 severo, por lo que se han propuesto inhibidores de esta citocina para el tratamiento de casos severos de esta enfermedad (197).

Desde el inicio de la pandemia por COVID-19 ha habido un esfuerzo global por la identificación de factores de pronóstico de severidad para los pacientes (2). En ese sentido, se han reportado una serie de factores de pronóstico que determinan a un paciente como severo, un metaanálisis que ha considerado los estudios publicados al respecto encontró que

los factores predictores de severidad con evidencia que proporciona una alta certeza, son: mayor edad, sexo masculino, tabaquismo, presencia de al menos una comorbilidad, diabetes, obesidad, daño al miocardio y concentración alta de proteína C reactiva (198,199). En concordancia con lo anterior, nosotros encontramos una relación de dependencia por medio de chi cuadrada, entre el fallecimiento de los pacientes y el sexo masculino, así como con niveles más altos en la escala PSI por sus siglas en inglés (Pneumonia Severity Index), que evalúa el índice de severidad de neumonía, en donde valores más altos se asocian a mayor gravedad. También, se encontró una dependencia entre el fallecimiento y el haber recibido hemodiálisis, el ser negativo para IgG contra SARS-CoV-2, así como la subexpresión de CD86 y la sobreexpresión de NOD2 al día 7 de hospitalización, respectivamente. Con respecto a las variables cuantitativas de este estudio, se encontró una mayor concentración de creatinina al ingreso hospitalario en los pacientes que fallecieron, así como una mayor concentración de IL-10 al día 7 de hospitalización, en comparación con los pacientes que sobrevivieron. Por otro lado, en nuestra cohorte no se reportó una diferencia significativa entre los pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 de acuerdo a la edad que presentaban o con alguna de las comorbilidades reportadas, esto se puede deber al bajo número de sujetos involucrados en el estudio.

Cabe destacar que ya se ha reportado previamente que el sexo masculino es un factor de riesgo para desarrollar COVID-19 severo, un metaanálisis publicado menciona que los hombres con COVID-19 tienen 2.84 veces más probabilidad de ingresar a unidad de cuidados intensivos y 1.39 veces más probabilidad de morir por esta enfermedad, en comparación con las mujeres con COVID-19 (200). Lo anterior se puede explicar debido a que las mujeres presentan diferencias en la capacidad de respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, ya que se ha reportado que en las mujeres se tiene una mayor cantidad de linfocitos T CD4+, mayor actividad de linfocitos T CD8+ y mayor producción de inmunoglobulinas, en comparación con los hombres (201–203). Con respecto a la escala PSI se obtuvo un efecto asociado a lo esperado, ya que esta escala ya había sido recomendada para su uso en pacientes con COVID-19 (204). De igual forma la relación entre ser negativo para IgG contra SARS-CoV-2 y el fallecimiento, destaca la importancia de la respuesta inmune adaptativa en la resolución de la enfermedad (205). Por otro lado, lo encontrado respecto a la hemodiálisis y los niveles elevados de creatinina en pacientes fallecidos, confirma que los pacientes con

COVID-19 pueden generar daño renal y éste es un factor de riesgo para presentar un peor pronóstico (206). Para el caso de la plasmaféresis, que en este estudio no mostró una relación entre la administración de este tratamiento y la sobrevivencia, cabe señalar que en E.U.A. la FDA aprobó el uso de anticuerpos contra SARS-CoV-2 provenientes de sujetos convalecientes siempre y cuando sean títulos virales altos (>18.45 de unidades relativas de fluorescencia) ya que se ha observado que la administración de estos en etapas tempranas de la enfermedad reduce la mortalidad en pacientes hospitalizados con COVID-19 que no recibieron ventilación mecánica (207,208). En México también se utiliza como terapia la administración de anticuerpos de sujetos convalecientes de COVID-19, aunque no se ha obtenido la evidencia suficiente que compruebe su eficacia terapéutica, en parte por la variabilidad con respecto a los títulos de anticuerpos que son administrados y a que no se llevan a cabo ensayos que evalúen la capacidad neutralizante de los anticuerpos (209). Por último, la relación entre los pacientes fallecidos y la sobreexpresión de NOD2 y subexpresión de CD86, señala una sobre activación inmune por parte de NOD2 y su participación en la vía de NF- κ B, así como un déficit en la capacidad de presentar antígeno por parte de las células encargadas de esta función, que a su vez permiten de esta manera la activación de células T (168,176).

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, nosotros sugerimos tomar en cuenta los factores determinados como asociados a los pacientes fallecidos por COVID-19, para llevar a cabo un estudio que involucre una cohorte con una mayor cantidad de sujetos en condiciones de hospitalización en México, donde se puedan asociar con mayor evidencia factores de pronóstico para COVID-19 severo. El tener factores de pronóstico puede ser de gran ayuda para el manejo oportuno de pacientes con enfermedad severa y puede permitir el optimizar los recursos y las camas que se tienen en el área de cuidados intensivos de cada hospital, de esta forma se asegura la disponibilidad de los recursos hospitalarios específicamente para los pacientes que así lo requieran.

8. CONCLUSIONES

1. Se encontró una firma génica en las PBMC de los pacientes hospitalizados con COVID-19, en donde CASP8, CCL5, CHUK, CXCL11, FOS, IFNA1, IFNA2, IFNB1, IL12B, MAP2K1, MAP2K3, MAPK14, MAPK3 PYDC1, RELA, SPP1 y TRAF3 se encontraron incrementados, mientras que CD86, CTSS, IRF5, MEFV, TLR8 y TRADD se encontraron disminuidos.
2. La expresión de los genes MX1 y OAS2 al día del ingreso hospitalario se encontró incrementada en las PBMC de los pacientes que fallecieron, en comparación con los que sobrevivieron a la hospitalización por COVID-19.
3. Al día 7 de hospitalización se encontraron incrementados los genes RIPK1, NOD2, CXCL9, DHX58, PYDC1, FADD, IFNA1, IFNA2, IL12B y TRAF6, mientras que CD86 se encontró disminuido en las PBMC de pacientes que fallecieron con COVID-19.
4. Se encontraron disminuidos los genes: CARD9, CCL5, IFNB1, IL15, IL18 PIN1 y TLR3 en las PBMC de pacientes fallecidos con COVID-19 al tercer día de hospitalización en comparación con el día de ingreso hospitalario.
5. Se encontró incrementada la concentración de IL-10 en suero al día 7 de hospitalización en los pacientes fallecidos por COVID-19 en comparación con los sobrevivientes.
6. Los pacientes fallecidos mostraron niveles más altos de creatinina al ingreso hospitalario. Así mismo, se encontró una relación de dependencia entre el fallecimiento de los pacientes y el sexo masculino, el haber recibido hemodiálisis, el presentar niveles más altos en la escala PSI, el ser negativo para IgG contra SARS-CoV-2, así como la subexpresión de CD86 y la sobreexpresión de NOD2 al día 7 de hospitalización, respectivamente.
7. En nuestra cohorte no se reportó una diferencia significativa entre los pacientes sobrevivientes y fallecidos con COVID-19 de acuerdo con la edad o la comorbilidad presentada.

9. REFERENCIAS

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Jan 24;382(8):727–33. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
2. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497–506.
3. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* [Internet]. 2020 Feb 22;395(10224):565–74. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
4. Gao GF. From “A”IV to “Z”IKV: Attacks from Emerging and Re-emerging Pathogens. *Cell* [Internet]. 2018 Mar 8;172(6):1157–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.025>
5. Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt H-R, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003 May;348(20):1967–76.
6. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. 2012 Nov;367(19):1814–20.
7. WHO. WHO announces COVID-19 outbreak a pandemic [Internet]. World Health Organization; 2020 Mar [cited 2020 May 11]. Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/news/news/2020/3/who-announces-covid-19-outbreak-a-pandemic>
8. Organization WH. Weekly Operational Update on COVID-19. 2021.
9. Salud S de. Informe Técnico Diario COVID-19 MÉXICO 30/05/2021. 2021.
10. Barnard DL. Coronaviruses : Molecular and Cellular Biology. 2008;3:119–23.

11. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). *Arch Virol*. 2016 Oct;161(10):2921–49.
12. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2020;91:264–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971220300114>
13. Ren L-L, Wang Y-M, Wu Z-Q, Xiang Z-C, Guo L, Xu T, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chin Med J (Engl)* [Internet]. 2020;133(9). Available from: https://journals.lww.com/cmj/Fulltext/2020/05050/Identification_of_a_novel_corona_virus_causing.3.aspx
14. Mortola E, Roy P. Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Lett*. 2004 Oct;576(1–2):174–8.
15. Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res*. 2006;66:193–292.
16. Dent SD, Xia D, Wastling JM, Neuman BW, Britton P, Maier HJ. The proteome of the infectious bronchitis virus Beau-R virion. *J Gen Virol*. 2015 Dec;96(12):3499–506.
17. Kim D, Lee J, Yang J, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 2020 May;181(4):1–29.
18. Viral Zone Swiss Institute of Bioinformatics. SARS coronavirus 2/Covid-19 genome expression [Internet]. 2020 [cited 2020 Jun 3]. Available from: <https://viralzone.expasy.org/9076>
19. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020 Mar;579(7798):265–9.

20. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020 Mar;579(7798):270–3.
21. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol*. 2016 Sep;3(1):237–61.
22. Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DHW, Muller MA, Dijkman R, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*. 2013 Mar;495(7440):251–4.
23. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*. 2012 Jun;4(6):1011–33.
24. Shirato K, Kawase M, Matsuyama S. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Mediated by the Transmembrane Serine Protease TMPRSS2. *J Virol* [Internet]. 2013 Dec 1;87(23):12552 LP – 12561. Available from: <http://jvi.asm.org/content/87/23/12552.abstract>
25. Wilson L, Gage P, Ewart G. Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. *Virology*. 2006 Sep;353(2):294–306.
26. Torres J, Maheswari U, Parthasarathy K, Ng L, Liu DX, Gong X. Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein. *Protein Sci* [Internet]. 2007 Sep;16(9):2065–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17766393>
27. Vennema H, Godeke GJ, Rossen JW, Voorhout WF, Horzinek MC, Opstelten DJ, et al. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J*. 1996 Apr;15(8):2020–8.
28. Ujike M, Taguchi F. Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses* [Internet]. 2015 Apr 3;7(4):1700–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25855243>
29. Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct*

Biol. 2011 Apr;174(1):11–22.

30. Neuman BW, Buchmeier MJ. Supramolecular Architecture of the Coronavirus Particle. *Adv Virus Res.* 2016;96:1–27.
31. van der Hoeven B, Oudshoorn D, Koster AJ, Snijder EJ, Kikkert M, Barcena M. Biogenesis and architecture of arterivirus replication organelles. *Virus Res.* 2016 Jul;220:70–90.
32. Oudshoorn D, Rijs K, Limpens RWAL, Groen K, Koster AJ, Snijder EJ, et al. Expression and Cleavage of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus nsp3-4 Polyprotein Induce the Formation of Double-Membrane Vesicles That Mimic Those Associated with Coronaviral RNA Replication. *MBio.* 2017 Nov;8(6).
33. Zalinger ZB, Elliott R, Rose KM, Weiss SR. MDA5 Is Critical to Host Defense during Infection with Murine Coronavirus. Perlman S, editor. *J Virol* [Internet]. 2015 Dec 15;89(24):12330 LP – 12340. Available from: <http://jvi.asm.org/content/89/24/12330.abstract>
34. He Y, Xie Z, Dai J, Cao Y, Hou J, Zheng Y, et al. Responses of the Toll-like receptor and melanoma differentiation-associated protein 5 signaling pathways to avian infectious bronchitis virus infection in chicks. *Virol Sin.* 2016 Feb;31(1):57–68.
35. Snijder EJ, Bredenbeek PJ, Dobbe JC, Thiel V, Ziebuhr J, Poon LLM, et al. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol.* 2003 Aug;331(5):991–1004.
36. Jauregui AR, Savalia D, Lowry VK, Farrell CM, Wathelet MG. Identification of residues of SARS-CoV nsp1 that differentially affect inhibition of gene expression and antiviral signaling. *PLoS One.* 2013;8(4):e62416.
37. Cornillez-Ty CT, Liao L, Yates JR 3rd, Kuhn P, Buchmeier MJ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. *J*

Viol. 2009 Oct;83(19):10314–8.

38. Báez-Santos YM, St John SE, Mesecar AD. The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. *Antiviral Res.* 2015 Mar;115:21–38.
39. Sakai Y, Kawachi K, Terada Y, Omori H, Matsuura Y, Kamitani W. Two-amino acids change in the nsp4 of SARS coronavirus abolishes viral replication. *Virology.* 2017 Oct;510:165–74.
40. Wu C, Liu Y, Yang Y, Zhang P, Zhong W, Wang Y, et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B.* 2020 Feb;
41. Angelini MM, Akhlaghpour M, Neuman BW, Buchmeier MJ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *MBio.* 2013 Aug;4(4).
42. Kirchdoerfer RN, Ward AB. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nat Commun.* 2019 May;10(1):2342.
43. Snijder EJ, Decroly E, Ziebuhr J. The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing [Internet]. 1st ed. Vol. 96, *Advances in Virus Research.* Elsevier Inc.; 2016. 59–126 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.008>
44. Jang K-J, Jeong S, Kang DY, Sp N, Yang YM, Kim D-E. A high ATP concentration enhances the cooperative translocation of the SARS coronavirus helicase nsP13 in the unwinding of duplex RNA. *Sci Rep.* 2020 Mar;10(1):4481.
45. Deng X, Hackbart M, Mettelman RC, O'Brien A, Mielech AM, Yi G, et al. Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 May;114(21):E4251–60.
46. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med [Internet].* 2020;26(5):681–7. Available from:

<https://doi.org/10.1038/s41591-020-0868-6>

47. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000 Sep;87(5):E1-9.
48. Wang W, McKinnie SMK, Farhan M, Paul M, McDonald T, McLean B, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Metabolizes and Partially Inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17: Physiological Effects in the Cardiovascular System. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2016 Aug;68(2):365–77.
49. Li W, Zhang C, Sui J, Kuhn JH, Moore MJ, Luo S, et al. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J [Internet]*. 2005/03/24. 2005 Apr 20;24(8):1634–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15791205>
50. Glycoprotein C-S, Walls AC, Park Y, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, et al. Structure , Function , and Antigenicity of the SARS- Structure , Function , and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell [Internet]*. 2020;181(2):281-292.e6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
51. Tian X, Li C, Huang A, Xia S, Lu S, Shi Z, et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg Microbes Infect [Internet]*. 2020 Jan 1;9(1):382–5. Available from: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1729069>
52. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell [Internet]*. 2020;181(2):271-280.e8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420302294>
53. Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 2009/03/24. 2009 Apr 7;106(14):5871–6. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19321428>

54. Zhavoronkov A, Aladinskiy V, Zhebrak A, Zagribelnyy B, Terentiev V, Bezrukov DS, et al. Potential COVID-2019 3C-like Protease Inhibitors Designed Using Generative Deep Learning Approaches [Internet]. 2020. Available from: https://chemrxiv.org/articles/Potential_2019-nCoV_3C-like_Protease_Inhibitors_Designed_Using_Generative_Deep_Learning_Approaches/11829102
55. Brown CG, Nixon KS, Senanayake SD, Brian DA. An RNA stem-loop within the bovine coronavirus nsp1 coding region is a cis-acting element in defective interfering RNA replication. *J Virol*. 2007 Jul;81(14):7716–24.
56. Trincone A, Schwegmann-Wessels C. Looking for a needle in a haystack: Cellular proteins that may interact with the tyrosine-based sorting signal of the TGEV S protein. *Virus Res*. 2015 Apr;202:3–11.
57. Weisz OA, Swift AM, Machamer CE. Oligomerization of a membrane protein correlates with its retention in the Golgi complex. *J Cell Biol* [Internet]. 1993 Sep 15;122(6):1185–96. Available from: <https://doi.org/10.1083/jcb.122.6.1185>
58. Venkatagopalan P, Daskalova SM, Lopez LA, Dolezal KA, Hogue BG. Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. *Virology*. 2015 Apr;478:75–85.
59. Krijnse-Locker J, Ericsson M, Rottier PJ, Griffiths G. Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J Cell Biol*. 1994 Jan;124(1–2):55–70.
60. de Haan CAM, Rottier PJM. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv Virus Res*. 2005;64:165–230.
61. Bombardini T, Picano E. Angiotensin-Converting Enzyme 2 as the Molecular Bridge Between Epidemiologic and Clinical Features of COVID-19. *Can J Cardiol* [Internet]. 2020/03/29. 2020 May;36(5):784.e1-784.e2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32299780>

62. Peiris JSM, Chu CM, Cheng VCC, Chan KS, Hung IFN, Poon LLM, et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* [Internet]. 2003;361(9371):1767–72.
Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673603134125>
63. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. Vol. 8, *The Lancet. Respiratory medicine*. England; 2020. p. 420–2.
64. Qian Z, Travanty EA, Oko L, Edeen K, Berglund A, Wang J, et al. Innate immune response of human alveolar type II cells infected with severe acute respiratory syndrome-coronavirus. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2013 Jun;48(6):742–8.
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23418343>
65. Marten NW, Stohlman SA, Bergmann CC. MHV infection of the CNS: mechanisms of immune-mediated control. *Viral Immunol*. 2001;14(1):1–18.
66. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe*. 2019 Jan;25(1):13–26.
67. Liu C, Xu HY, Liu DX. Induction of caspase-dependent apoptosis in cultured cells by the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol*. 2001 Jul;75(14):6402–9.
68. Lavi E, Wang Q, Weiss SR, Gonatas NK. Syncytia formation induced by coronavirus infection is associated with fragmentation and rearrangement of the Golgi apparatus. *Virology*. 1996 Jul;221(2):325–34.
69. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* [Internet]. 2020 Mar 28;395(10229):1033–4. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
70. Tian S, Hu W, Niu L, Liu H, Xu H, Xiao S-Y. Pulmonary Pathology of Early-Phase

2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia in Two Patients With Lung Cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2020 May;15(5):700–4.

71. Newton AH, Cardani A, Braciale TJ. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2016 Jul;38(4):471–82.
72. Zhang X, Tan Y, Ling Y, Lu G, Liu F, Yi Z, et al. Viral and host factors related to the clinical outcome of COVID-19. *Nature* [Internet]. 2020; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2355-0>
73. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*. 1996 Jun;271(25):15292–7.
74. Presta M, Andrés G, Leali D, Dell’Era P, Ronca R. Inflammatory cells and chemokines sustain FGF2-induced angiogenesis. *Eur Cytokine Netw*. 2009 Jun;20(2):39–50.
75. Metcalf D. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science*. 1985 Jul;229(4708):16–22.
76. Lee F, Yokota T, Otsuka T, Gemmell L, Larson N, Luh J, et al. Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Jul;82(13):4360–4.
77. Zoon KC, Miller D, Bekisz J, zur Nedden D, Enterline JC, Nguyen NY, et al. Purification and characterization of multiple components of human lymphoblastoid interferon-alpha. *J Biol Chem*. 1992 Jul;267(21):15210–6.
78. Grajales-Reyes GE, Colonna M. Interferon responses in viral pneumonias. *Science* (80-). 2020;369(6504):626–7.
79. Hisamatsu H, Shimbara N, Saito Y, Kristensen P, Hendil KB, Fujiwara T, et al. Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *J Exp Med*. 1996 Apr;183(4):1807–16.

80. El Bougrini J, Pampin M, Chelbi-Alix MK. Arsenic enhances the apoptosis induced by interferon gamma: key role of IRF-1. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2006 May;52(1):9–15.
81. Yoon S Il, Logsdon NJ, Sheikh F, Donnelly RP, Walter MR. Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J Biol Chem*. 2006 Nov;281(46):35088–96.
82. Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*. 1993 Mar;362(6417):248–50.
83. Hardy MP, Owczarek CM, Jermini LS, Ejdebäck M, Hertzog PJ. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics*. 2004 Aug;84(2):331–45.
84. Van Damme J, De Ley M, Opdenakker G, Billiau A, De Somer P, Van Beeumen J. Homogeneous interferon-inducing 22K factor is related to endogenous pyrogen and interleukin-1. *Nature*. 1985 Mar;314(6008):266–8.
85. Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int Immunol*. 2000 Feb;12(2):151–60.
86. Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*. 1988 May;240(4856):1169–76.
87. Yokota T, Otsuka T, Mosmann T, Banchereau J, DeFrance T, Blanchard D, et al. Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Aug;83(16):5894–8.
88. Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity [Internet]*. 2019 Apr 16;50(4):1007–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.026>
89. Namen AE, Schmierer AE, March CJ, Overell RW, Park LS, Urdal DL, et al. B cell

- precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *J Exp Med*. 1988 Mar;167(3):988–1002.
90. Van Damme J, Rampart M, Conings R, Decock B, Van Osselaer N, Willems J, et al. The neutrophil-activating proteins interleukin 8 and beta-thromboglobulin: in vitro and in vivo comparison of NH₂-terminally processed forms. *Eur J Immunol*. 1990 Sep;20(9):2113–8.
 91. Goswami R, Kaplan MH. A Brief History of IL-9. *J Immunol* [Internet]. 2011 Mar 15;186(6):3283 LP – 3288. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/186/6/3283.abstract>
 92. Romagnani P, Annunziato F, Lazzeri E, Cosmi L, Beltrame C, Lasagni L, et al. Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alphabeta⁺ CD8⁺ single-positive T cells, TCRgammadelta⁺ T cells, and natural killer-type cells in human thymus. *Blood*. 2001 Feb;97(3):601–7.
 93. Zhang YJ, Rutledge BJ, Rollins BJ. Structure/activity analysis of human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by mutagenesis. Identification of a mutated protein that inhibits MCP-1-mediated monocyte chemotaxis. *J Biol Chem*. 1994 Jun;269(22):15918–24.
 94. Weber M, Uguccioni M, Baggiolini M, Clark-Lewis I, Dahinden CA. Deletion of the NH₂-terminal residue converts monocyte chemotactic protein 1 from an activator of basophil mediator release to an eosinophil chemoattractant. *J Exp Med*. 1996 Feb;183(2):681–5.
 95. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science*. 1995 Dec;270(5243):1811–5.
 96. Vanlandewijck M, Lebouvier T, Andaloussi Mäe M, Nahar K, Hornemann S, Kenkel D, et al. Functional Characterization of Germline Mutations in PDGFB and

PDGFRB in Primary Familial Brain Calcification. PLoS One. 2015;10(11):e0143407.

97. Nie H, Zheng Y, Li R, Guo TB, He D, Fang L, et al. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis. Nat Med. 2013 Mar;19(3):322–8.
98. Murphy JF, Fitzgerald DJ. Vascular endothelial growth factor induces cyclooxygenase-dependent proliferation of endothelial cells via the VEGF-2 receptor. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2001 Jul;15(9):1667–9.
99. Semaan N, Alsaleh G, Gottenberg J-E, Wachsmann D, Sibilia J. Etk/BMX, a Btk family tyrosine kinase, and Mal contribute to the cross-talk between MyD88 and FAK pathways. J Immunol. 2008 Mar;180(5):3485–91.
100. Rabi FA, Al Zoubi MS, Kasasbeh GA, Salameh DM, Al-Nasser AD. SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. Pathog (Basel, Switzerland). 2020 Mar;9(3).
101. Prompetchara E, Ketloy C, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. Asian Pacific J allergy Immunol. 2020 Mar;38(1):1–9.
102. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. J Med Virol. 2020 Apr;92(4):424–32.
103. Totura AL, Baric RS. SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon. Curr Opin Virol. 2012 Jun;2(3):264–75.
104. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. J Pharm Anal. 2020 Mar;
105. Frieman MB, Chen J, Morrison TE, Whitmore A, Funkhouser W, Ward JM, et al. SARS-CoV Pathogenesis Is Regulated by a STAT1 Dependent but a Type I, II and III Interferon Receptor Independent Mechanism. PLOS Pathog [Internet]. 2010 Apr 8;6(4):e1000849. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000849>

106. Kopecky-Bromberg SA, Martínez-Sobrido L, Frieman M, Baric RA, Palese P. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J Virol*. 2007 Jan;81(2):548–57.
107. Kamitani W, Narayanan K, Huang C, Lokugamage K, Ikegami T, Ito N, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2006 Aug 22;103(34):12885 LP – 12890. Available from: <http://www.pnas.org/content/103/34/12885.abstract>
108. Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, Narayanan K, Semler BL, Makino S. SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. *PLoS Pathog*. 2011 Dec;7(12):e1002433.
109. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, Mack M, Zhao J, Meyerholz DK, et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host Microbe [Internet]*. 2016;19(2):181–93. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312816300063>
110. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu W-C, Uhl S, Hoagland D, Möller R, et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell [Internet]*. 2020;1–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
111. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *N Engl J Med [Internet]*. 2020 Jan 29;382(13):1199–207. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>
112. Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofy KH, Wiesman J, Bruce H, et al. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N Engl J Med [Internet]*. 2020 Jan 31;382(10):929–36. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191>
113. Wang W, Tang J, Wei F. Updated understanding of the outbreak of 2019 novel

- coronavirus (2019-nCoV) in Wuhan, China. *J Med Virol* [Internet]. 2020 Apr 1;92(4):441–7. Available from: <https://doi.org/10.1002/jmv.25689>
114. CDC. Interim Clinical Guidance for Management of Patients with Confirmed Coronavirus Disease (COVID-19) [Internet]. Clinical Care. 2021. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-guidance-management-patients.html>
 115. Gandhi RT, Lynch JB, del Rio C. Mild or Moderate Covid-19. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Apr 24;383(18):1757–66. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMcp2009249>
 116. Society AT. Novel Wuhan (2019-nCoV) Coronavirus. 2020.
 117. Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeh AA, Al-Rabiah FA, Al-Hajjar S, Al-Barrak A, et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2013;13(9):752–61. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309913702044>
 118. Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM, et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med*. 2003 May;348(20):1986–94.
 119. Gao Q, Bao L, Mao H, Wang L, Xu K, Yang M, et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science* (80-) [Internet]. 2020 May 6;eabc1932. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/early/2020/05/06/science.abc1932.abstract>
 120. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) Situation Report-139 [Internet]. 2020 [cited 2020 Jun 8]. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200607-covid-19-sitrep-139.pdf?sfvrsn=79dc6d08_2
 121. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of

- 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. JAMA [Internet]. 2020 Apr 7;323(13):1239–42. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
122. Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud México. Aviso Epidemiológico 17 de marzo del 2020 [Internet]. 2020. Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/541794/AE_Enfermedad_COVID-19_SARS-CoV-2_2020.03.17.pdf
 123. CCSE. México-COVID-19-Crisis del coronavirus. Expansión [Internet]. 2021 Jun 23;1. Available from: <https://datosmacro.expansion.com/otros/coronavirus/mexico>
 124. Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, To KK-W, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. Lancet (London, England). 2020 Feb;395(10223):514–23.
 125. To KK-W, Tsang OT-Y, Leung W-S, Tam AR, Wu T-C, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. Lancet Infect Dis. 2020 May;20(5):565–74.
 126. I-BASE. Log value conversion table [Internet]. 2007. Available from: <https://i-base.info/log-value-conversion-table/>
 127. Chen Y, Li L. SARS-CoV-2: virus dynamics and host response. Lancet Infect Dis [Internet]. 2020;20(5):515–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30235-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30235-8)
 128. Chen Y, Shan K, Qian W. Asians Do Not Exhibit Elevated Expression or Unique Genetic Polymorphisms for ACE2, the Cell-Entry Receptor of SARS-CoV-2. 2020 Feb 25 [cited 2020 May 13]; Available from: <https://www.preprints.org/manuscript/202002.0258/v2>
 129. Organization WH. Clinical management Living guidance COVID-19. 2021;(January).

130. Hinton D. Veklury (remdesivir) EUA Letter of Approval. 2020.
131. Administration F and D. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes Monoclonal Antibody for Treatment of COVID-19 [Internet]. 2020. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-monoclonal-antibody-treatment-covid-19>
132. RECOVERY. Low-cost dexamethasone reduces death by up to one third in hospitalised patients with severe respiratory complications [Internet]. 2020. Available from: <https://www.recoverytrial.net/news/low-cost-dexamethasone-reduces-death-by-up-to-one-third-in-hospitalised-patients-with-severe-respiratory-complications-of-covid-19>
133. Salud S de. Uso de medicamentos de eficacia no demostrada en pacientes con COVID-19 atendidos en Hospitales en la República. 2020 p. 1–4.
134. Uso de dexametasona en pacientes hospitalizados por. 2020;(June):2020.
135. Organization WH. Coronavirus disease (COVID-19): Vaccines [Internet]. 2021. Available from: [https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines](https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines)
136. Cortés Alcalá R, Gómez Torres R, Alba Ricaño X. Política nacional rectora de vacunación contra el virus SARS-CoV-2 para la prevención de la COVID-19.
137. México G de. COVID-19 MÉXICO-Comunicado técnico diario-Fase III Lunes 22 de marzo del 2021. Ciudad de México; 2021.
138. Salud S de. 221. Continúa descenso de contagios por COVID-19 en México. 2021.
139. Amanat F, Krammer F. Perspective SARS-CoV-2 Vaccines : Status Report. 2020;(January).
140. Feng Z, Diao B, Wang R, Wang G, Wang C, Tan Y, et al. The Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Directly Decimates Human Spleens and Lymph Nodes Running title : SARS-CoV-2 infects human spleens and lymph nodes. 2020;2:1–18.

141. Diao B, Wang C, Wang R, Feng Z, Tan Y, Wang H, et al. Human Kidney is a Target for Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection. medRxiv [Internet]. 2020 Jan 1;2020.03.04.20031120. Available from: <http://medrxiv.org/content/early/2020/04/10/2020.03.04.20031120.abstract>
142. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. The landscape of lung bronchoalveolar immune cells in COVID-19 revealed by single-cell RNA sequencing. medRxiv [Internet]. 2020 Jan 1;2020.02.23.20026690. Available from: <http://medrxiv.org/content/early/2020/02/26/2020.02.23.20026690.abstract>
143. Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Sun R, Tian Z, et al. Pathogenic T cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storm in severe COVID-19 patients. Natl Sci Rev. 2020;1–5.
144. Zhang D, Guo R, Lei L, Liu H, Wang Y, Wang Y, et al. COVID-19 infection induces readily detectable morphological and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes , the. 2020;
145. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. JAMA [Internet]. 2020 Mar 17;323(11):1061–9. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
146. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin - converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS - CoV - 2 receptor : molecular mechanisms and potential therapeutic target. Intensive Care Med [Internet]. 2020;46(4):586–90. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>
147. Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ. Severe Covid-19. N Engl J Med. 2020 Dec;383(25):2451–60.
148. Olivas-Martínez A, Cárdenas-Fragoso JL, Jiménez JV, Lozano-Cruz OA, Ortiz-Brizuela E, Tovar-Méndez VH, et al. In-hospital mortality from severe COVID-19 in a tertiary care center in Mexico City; causes of death, risk factors and the impact of hospital saturation. PLoS One. 2021;16(2 February):1–17.

149. Amil B, Nasional Z, BAZNAS, Badan K, Zakat A, Republik N, et al. No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における 健康関連指標に関する共分散構造分析Title. J Chem Inf Model [Internet]. 2020;21(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101607><https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2020.02.034><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cjag.12228><https://doi.org/10.1016/j.ssci.2020.104773><https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.011><https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.011>
150. Suárez V, Suarez Quezada M, Oros Ruiz S, Ronquillo De Jesús E. Epidemiology of COVID-19 in Mexico: from the 27th of February to the 30th of April 2020 TT - Epidemiología de COVID-19 en México: del 27 de febrero al 30 de abril de 2020. Rev Clin Esp [Internet]. 2020/05/27. 2020 Nov;220(8):463–71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7250750/>
151. Vera-Zertuche JM, Mancilla-Galindo J, Tlalpa-Prisco M, Aguilar-Alonso P, Aguirre-García MM, Segura-Badilla O, et al. Obesity is a strong independent risk factor for short-term mortality and adverse outcomes in Mexican patients with COVID-19: A national observational study. Cambridge Open Engag [Internet]. 2021;(May). Available from: <https://www.cambridge.org/engage/coe/article-details/5fee8fd80bf9660018a258c0>
152. Kim PS, Read SW, Fauci AS. Therapy for Early COVID-19: A Critical Need. JAMA [Internet]. 2020 Dec 1;324(21):2149–50. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.22813>
153. Shaath H, Alajez NM. Identification of PBMC-based molecular signature associational with COVID-19 disease severity. Heliyon [Internet]. 2021;7(5):e06866. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844021009695>
154. Zhang Q, Meng Y, Wang K, Zhang X, Chen W, Sheng J, et al. Inflammation and Antiviral Immune Response Associated With Severe Progression of COVID-19 [Internet]. Vol. 12, Frontiers in Immunology . 2021. p. 135. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.631226>

155. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020;584(7821):463–9.
156. Sarkar SN, Ghosh A, Wang HW, Sung SS, Sen GC. The nature of the catalytic domain of 2'-5'-oligoadenylate synthetases. *J Biol Chem*. 1999 Sep;274(36):25535–42.
157. Horisberger MA, Staeheli P, Haller O. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1983 Apr;80(7):1910–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6188159>
158. Staeheli P, Grob R, Meier E, Sutcliffe JG, Haller O. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol Cell Biol*. 1988 Oct;8(10):4518–23.
159. Krug RM, Shaw M, Broni B, Shapiro G, Haller O. Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product. *J Virol*. 1985 Oct;56(1):201–6.
160. Meyer T, Horisberger MA. Combined action of mouse alpha and beta interferons in influenza virus-infected macrophages carrying the resistance gene Mx. *J Virol* [Internet]. 1984 Mar;49(3):709–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6321758>
161. Bizzotto J, Sanchis P, Abbate M, Lage-Vickers S, Lavignolle R, Toro A, et al. SARS-CoV-2 Infection Boosts MX1 Antiviral Effector in COVID-19 Patients. *iScience* [Internet]. 2020;23(10):101585. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S258900422030777X>
162. Sarkar SN, Bandyopadhyay S, Ghosh A, Sen GC. Enzymatic characteristics of recombinant medium isozyme of 2'-5' oligoadenylate synthetase. *J Biol Chem*. 1999 Jan;274(3):1848–55.
163. Hartmann R, Walko G, Justesen J. Inhibition of 2'-5' oligoadenylate synthetase by

- divalent metal ions. *FEBS Lett.* 2001 Oct;507(1):54–8.
164. Schmidt N, Lareau CA, Keshishian H, Ganski S, Schneider C, Hennig T, et al. The SARS-CoV-2 RNA–protein interactome in infected human cells. *Nat Microbiol* [Internet]. 2021;6(3):339–53. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00846-z>
 165. Li Y, Renner DM, Comar CE, Whelan JN, Reyes HM, Cardenas-Diaz FL, et al. SARS-CoV-2 induces double-stranded RNA-mediated innate immune responses in respiratory epithelial-derived cells and cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2021 Apr 20;118(16):e2022643118. Available from: <http://www.pnas.org/content/118/16/e2022643118.abstract>
 166. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Feb 28;382(18):1708–20. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>
 167. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. INTERFERONS AND THEIR ACTIONS. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 1987 Jun 1;56(1):727–77. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.003455>
 168. Sabbah A, Chang TH, Harnack R, Frohlich V, Tominaga K, Dube PH, et al. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol.* 2009 Oct;10(10):1073–80.
 169. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol.* 2005 Sep;175(5):2851–8.
 170. Stehlik C, Krajewska M, Welsh K, Krajewski S, Godzik A, Reed JC. The PAAD/PYRIN-only protein POP1/ASC2 is a modulator of ASC-mediated nuclear-factor-kappa B and pro-caspase-1 regulation. *Biochem J.* 2003 Jul;373(Pt 1):101–13.
 171. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8–independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* [Internet]. 2000;1(6):489–95. Available from:

<https://doi.org/10.1038/82732>

172. Carrington PE, Sandu C, Wei Y, Hill JM, Morisawa G, Huang T, et al. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell*. 2006 Jun;22(5):599–610.
173. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, et al. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*. 2000 Oct;103(2):351–61.
174. Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F, Lazzeri E, Giannini S, Cosmi L, et al. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med*. 2003 Jun;197(11):1537–49.
175. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000 Nov;13(5):715–25.
176. Lanier LL, O’Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, et al. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol*. 1995 Jan;154(1):97–105.
177. Vissers M, Remijn T, Oosting M, de Jong DJ, Diavatopoulos DA, Hermans PWM, et al. Respiratory syncytial virus infection augments NOD2 signaling in an IFN- β -dependent manner in human primary cells. *Eur J Immunol*. 2012 Oct;42(10):2727–35.
178. Schweizer TA, Shambat SM, Vulin C, Hoeller S, Acevedo C, Huemer M, et al. Blunted Fas signaling favors RIPK1-driven neutrophil necroptosis in critically ill COVID-19 patients. *bioRxiv* [Internet]. 2021 Jan 1;2021.03.19.436166. Available from: <http://biorxiv.org/content/early/2021/03/19/2021.03.19.436166.abstract>
179. Simpson J, Loh Z, Ullah MA, Lynch JP, Werder RB, Collinson N, et al. Respiratory Syncytial Virus Infection Promotes Necroptosis and HMGB1 Release by Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Jun;201(11):1358–71.

180. Sugiyama M, Kinoshita N, Ide S, Nomoto H, Nakamoto T, Saito S, et al. Serum CCL17 level becomes a predictive marker to distinguish between mild/moderate and severe/critical disease in patients with COVID-19. *Gene* [Internet]. 2020/09/14. 2021 Jan 15;766:145145. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32941953>
181. Li S, Duan X, Li Y, Li M, Gao Y, Li T, et al. Differentially expressed immune response genes in COVID-19 patients based on disease severity. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2021/03/29. 2021 Mar 29;13(7):9265–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33780352>
182. Sohn KM, Lee SG, Kim HJ, Cheon S, Jeong H, Lee J, et al. COVID-19 Patients Upregulate Toll-like Receptor 4-mediated Inflammatory Signaling That Mimics Bacterial Sepsis. *J Korean Med Sci*. 2020 Sep;35(38):e343.
183. Roberts AI, Lee L, Schwarz E, Groh V, Spies T, Ebert EC, et al. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol*. 2001 Nov;167(10):5527–30.
184. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*. 1995 Nov;378(6552):88–91.
185. Lim JH, Liu Y, Reineke E, Kao H-Y. Mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 2 phosphorylates and promotes Pin1 protein-dependent promyelocytic leukemia protein turnover. *J Biol Chem*. 2011 Dec;286(52):44403–11.
186. Min S-H, Lau AW, Lee TH, Inuzuka H, Wei S, Huang P, et al. Negative regulation of the stability and tumor suppressor function of Fbw7 by the Pin1 prolyl isomerase. *Mol Cell*. 2012 Jun;46(6):771–83.
187. Bertin J, Guo Y, Wang L, Srinivasula SM, Jacobson MD, Poyet JL, et al. CARD9 is a novel caspase recruitment domain-containing protein that interacts with BCL10/CLAP and activates NF-kappa B. *J Biol Chem*. 2000 Dec;275(52):41082–6.
188. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, et al. Cutting

edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 2002 Dec;169(12):6668–72.

189. Menezes SM, Braz M, Llorens-rico V, Wauters J, Weyenbergh J Van. Correspondence Endogenous IFN β outcome in critical patients with COVID-19. *The Lancet Microbe* [Internet]. 2021;1(C):27–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00063-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00063-X)
190. Satış H, Özger HS, Aysert Yıldız P, Hızıl K, Gulbahar Ö, Erbaş G, et al. Prognostic value of interleukin-18 and its association with other inflammatory markers and disease severity in COVID-19. *Cytokine.* 2021 Jan;137:155302.
191. Hue S, Beldi-Ferchiou A, Bendib I, Surenaud M, Fourati S, Frapard T, et al. Uncontrolled Innate and Impaired Adaptive Immune Responses in Patients with COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020 Dec;202(11):1509–19.
192. Mack CL. Serum cytokines as biomarkers of disease and clues to pathogenesis. Vol. 46, *Hepatology* (Baltimore, Md.). United States; 2007. p. 6–8.
193. Chi Y, Ge Y, Wu B, Zhang W, Wu T, Wen T, et al. Serum Cytokine and Chemokine Profile in Relation to the Severity of Coronavirus Disease 2019 in China. *J Infect Dis* [Internet]. 2020 Aug 4;222(5):746–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32563194>
194. Avila-nava A, Cortes-telles A, Torres-erazo D, Stephanie L. Serum IL-6: A potential biomarker of mortality among SARS-CoV-2 infected patients in Mexico. *Cytokine.* 2020;143(January).
195. Zhao Y, Qin L, Zhang P, Li K, Liang L, Sun J, et al. Longitudinal Profiling of Cytokines and Chemokines in COVID-19 Reveals Inhibitory Mediators IL-1Ra and IL-10 Are Associated with Disease Severity While Elevated RANTES Is an Early Predictor of Mild Disease. *SSRN Electron J.* 2020;
196. Liu J, Li S, Liu J, Liang B, Wang X, Wang H, et al. Longitudinal characteristics of

lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*. 2020;55.

197. Lu L, Zhang H, Zhan M, Jun J, Yin H, Dauphars D, et al. A Misunderstood Role of Interlukin-10 in COVID-19 Pathogenesis. 2020.
198. Boari GEM, Chiarini G, Bonetti S, Malerba P, Bianco G, Faustini C, et al. Prognostic factors and predictors of outcome in patients with COVID-19 and related pneumonia: a retrospective cohort study. *Biosci Rep*. 2020;40(12):1–13.
199. Izcovich A, Ragusa MA, Tortosa F, Marzio MAL, Agnoletti C, Bengolea A, et al. Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review. *PLoS One*. 2020;15(11 November):1–30.
200. Peckham H, de Gruijter NM, Raine C, Radziszewska A, Ciurtin C, Wedderburn LR, et al. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1):6317. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19741-6>
201. Abdullah M, Chai P-S, Chong M-Y, Tohit ERM, Ramasamy R, Pei CP, et al. Gender effect on in vitro lymphocyte subset levels of healthy individuals. *Cell Immunol*. 2012;272(2):214–9.
202. Hewagama A, Patel D, Yarlagaadda S, Strickland FM, Richardson BC. Stronger inflammatory/cytotoxic T-cell response in women identified by microarray analysis. *Genes Immun*. 2009 Jul;10(5):509–16.
203. Stoica G, Macarie E, Michiu V, Stoica RC. Biologic variation of human immunoglobulin concentration. I. Sex-age specific effects on serum levels of IgG, IgA, IgM and IgD. *Med Interne*. 1980;18(3):323–32.
204. Anurag A, Preetam M. Validation of PSI/PORT, CURB-65 and SCAP scoring system in COVID-19 pneumonia for prediction of disease severity and 14-day mortality. *Clin Respir J*. 2021 May;15(5):467–71.
205. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-

- 19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020 Jun;181(7):1489-1501.e15.
206. Tarragón B, Valdenebro M, Serrano ML, Maroto A, Llópez-Carratalá MR, Ramos A, et al. Acute kidney failure in patients admitted due to COVID-19. *Nefrologia*. 2021;41(1):34–40.
207. Joyner MJ, Carter RE, Senefeld JW, Klassen SA, Mills JR, Johnson PW, et al. Convalescent Plasma Antibody Levels and the Risk of Death from Covid-19. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Jan 13;384(11):1015–27. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031893>
208. Hinton D. Convalescent Plasma EUA Letter of Authorization March 9, 2021. 2021.
209. Salud S de. Uso de plasma convaleciente para atención de pacientes graves por SARS-CoV-2. 2020.